

Aus dem Anatomischen Institut  
(Geschäftsführender Vorstand: Prof. Dr. med. J. Sievers)  
der Christian-Albrechts-Universität zu Kiel

# EFFEKTE DER WACHSTUMSFAKTOREN VEGF-C UND VEGF-D UND SIGNALTRANSDUKTION DES REZEPTORS VEGFR-3 IN ZELLEN DES ZENTRALEN NERVENSYSTEMS

**Inauguraldissertation**

zur

Erlangung der Würde eines Doktors der Zahnheilkunde  
der Medizinischen Fakultät  
der Christian-Albrechts-Universität zu Kiel

vorgelegt von

**SANDRA KRANICH**

aus Pinneberg

Kiel 2009

1. Berichterstatter: Prof. Dr. Mentlein

2. Berichterstatter: Prof. Dr. Held-Feindt

Tag der mündlichen Prüfung: 11. August 2009

Zum Druck genehmigt, Kiel, den 11. August 2009

gez. Prof. Dr. Fickenscher  
(Vorsitzender der Prüfungskommission)

# Inhaltsverzeichnis

<b>Abbildungsverzeichnis</b>	<b>iii</b>
<b>Tabellenverzeichnis</b>	<b>v</b>
<b>Abkürzungs- und Symbolverzeichnis</b>	<b>vii</b>
<b>1 Einleitung</b>	<b>1</b>
1.1 Überblick . . . . .	1
1.2 VEGF-Familie . . . . .	1
1.2.1 VEGF-A . . . . .	2
1.2.2 VEGF-B . . . . .	2
1.2.3 VEGF-C und VEGF-D . . . . .	3
1.2.4 VEGF-E . . . . .	5
1.2.5 VEGF-F . . . . .	5
1.2.6 PlGF . . . . .	5
1.3 VEGF-Rezeptoren . . . . .	5
1.3.1 VEGFR-1 . . . . .	5
1.3.2 VEGFR-2 . . . . .	7
1.3.3 VEGFR-3 . . . . .	7
1.4 Die Rolle des VEGF während der Gehirnentwicklung . . . . .	9
1.5 Fragestellung . . . . .	10
<b>2 Material und Methoden</b>	<b>11</b>
2.1 Materialien . . . . .	11
2.1.1 Antikörper . . . . .	11
2.1.2 Biochemikalien . . . . .	14
2.1.3 Enzyme . . . . .	15
2.1.4 Gebrauchsfertige Kits . . . . .	15
2.1.5 Geräte . . . . .	15
2.1.6 Hemmstoffe . . . . .	15
2.1.7 Medien, Lösungen und Puffer . . . . .	16
2.1.8 Peptide . . . . .	18
2.1.9 TaqMan-Primerprobes . . . . .	19

2.1.10	Verbrauchsmaterial . . . . .	19
2.1.11	Zellmaterial . . . . .	19
2.2	Methoden . . . . .	20
2.2.1	Realtime-RT-PCR . . . . .	20
2.2.2	Proliferationsassay . . . . .	24
2.2.3	Western Blot . . . . .	25
2.2.4	Immuncytochemie . . . . .	29
2.2.5	Migrationsversuch („Scratchtest“) . . . . .	30
<b>3</b>	<b>Ergebnisse</b>	<b>31</b>
3.1	Genexpression . . . . .	31
3.1.1	Genexpression der VEGF-Derivate in murinen Zelllinien . . . . .	31
3.1.2	Genexpression der VEGF-Rezeptoren in murinen Zelllinien . . . . .	34
3.1.3	Genexpression der VEGF-Derivate in murinen Geweben . . . . .	36
3.1.4	Genexpression der VEGF-Rezeptoren in murinen Geweben . . . . .	36
3.1.5	Glial precursor cells (GPC): Effekte von Zytokinen und VEGF-Derivaten auf die Genexpression . . . . .	39
3.2	VEGFR-1, VEGFR-2 und VEGFR-3 in der Immuncytochemie . . . . .	42
3.3	Einfluss von VEGF-Derivaten auf die Signaltransduktion . . . . .	44
3.3.1	Untersuchung der Kinasen Akt und Erk . . . . .	44
3.3.2	Zeitabhängigkeit der Phosphorylierung der Kinase Erk nach Stimulie- rung mit VEGF-Derivaten . . . . .	44
3.3.3	Inhibitionsversuche . . . . .	44
3.4	Effekte von VEGF-C und -D auf die Proliferation der Glial precursor cells . . .	47
3.5	Die Zellmigration im Scratchversuch . . . . .	48
3.5.1	Genexpression der VEGF-Derivate in humanen kultivierten Zelllinien . .	50
<b>4</b>	<b>Diskussion</b>	<b>53</b>
4.1	Angiogenese und Neurogenese . . . . .	53
4.2	VEGF-C, VEGF-D und VEGFR-3 im Zentralen Nervensystem . . . . .	54
4.2.1	Charakterisierung der Glial precursor cells (GPC) . . . . .	55
4.2.2	Effekte von VEGF-C, VEGF-D und VEGFR-3 in Glial precursor cells .	56
<b>5</b>	<b>Zusammenfassung</b>	<b>61</b>
	<b>Literaturverzeichnis</b>	<b>63</b>
	<b>Danksagung</b>	<b>71</b>
	<b>Lebenslauf</b>	<b>73</b>



# Abbildungsverzeichnis

1.1	Schematische Darstellung der proteolytischen Reifung des VEGF-D . . . . .	4
1.2	Schematische Darstellung der VEGF-Rezeptoren mit ihren Liganden . . . . .	6
1.3	Kristallstruktur des VEGF/VEGFR-Komplexes . . . . .	7
1.4	Darstellung verschiedener VEGFR-2-Signalkaskaden . . . . .	8
3.1	VEGF-A-Expression in murinen Zelllinien . . . . .	32
3.2	VEGF-C-Expression in murinen Zelllinien . . . . .	33
3.3	VEGF-D-Expression in murinen Zelllinien . . . . .	33
3.4	VEGFR-1-Expression in murinen Zelllinien . . . . .	34
3.5	VEGFR-2-Expression in murinen Zelllinien . . . . .	35
3.6	VEGFR-3-Expression in murinen Zelllinien . . . . .	35
3.7	VEGF-A-Expression in murinen Geweben . . . . .	37
3.8	VEGF-C und -D-Expressionen in murinen Geweben . . . . .	37
3.9	VEGFR-1-Expression in murinen Geweben . . . . .	38
3.10	VEGFR-2 und -3-Expressionen in murinen Geweben . . . . .	38
3.11	Regulation der Genexpression von VEGF-C nach Stimulation der Glial precursor cells (GPC) . . . . .	39
3.12	Regulation der Genexpression von VEGF-D nach Stimulation der Glial precursor cells (GPC) . . . . .	40
3.13	Regulation der Genexpression von VEGFR-2 nach Stimulation der Glial precursor cells (GPC) . . . . .	41
3.14	Regulation der Genexpression von VEGFR-3 nach Stimulation der Glial precursor cells (GPC) . . . . .	42
3.15	Immunfluoreszenzfärbung von VEGFR-1 (grün), VEGFR-2 bzw. VEGFR-3 (rot) und Kernfärbung (blau) in 20facher und 40facher Vergrößerung . . . . .	43
3.16	Kinetik der Erk-Phosphorylierung . . . . .	45
3.17	Zeitabhängigkeit der Erk-Phosphorylierung mit VEGF-C . . . . .	46
3.18	Zeitabhängigkeit der Erk-Phosphorylierung mit VEGF-C <sub>152S</sub> . . . . .	46
3.19	10 Minuten Zeitabhängigkeit VEGF-C und VEGF-D mit/ohne Kinase-Inhibitor . . . . .	47
3.20	Verlauf der Migration mit und ohne Stimulation mit VEGF-D (100 ng/ml) . . . . .	49
3.21	Einzelbilder des Migrationsverlauf zu Beginn, nach sechs und nach zehn Stunden . . . . .	49
3.22	VEGF-C-Expression in humanen Zelllinien . . . . .	50

3.23	VEGF-D-Expression in humanen Zelllinien . . . . .	51
3.24	VEGFR-3-Expression in humanen Zelllinien . . . . .	51
4.1	Subventrikuläre und subgranuläre Zone . . . . .	54
4.2	Schema der Gliazell-Entwicklung . . . . .	57
4.3	Schema der Signaltransduktionskaskade des VEGFR-3 . . . . .	59
5.1	Überblick über die Wirkung von VEGF-D/VEGFR-3 in Glial precursor cells . .	62

# Tabellenverzeichnis

1.1	Überblick über die VEGF-Familie . . . . .	2
2.1	Antikörper zum immuncytochemischen Nachweis von VEGF Rezeptor Typ 1 (VEGFR-1) . . . . .	11
2.2	Antikörper zum immuncytochemischen Nachweis von VEGF Rezeptor Typ 2 (VEGFR-2) . . . . .	11
2.3	Antikörper zum immuncytochemischen Nachweis von VEGF Rezeptor Typ 3 (VEGFR-3) . . . . .	12
2.4	Antikörper zum Nachweis der Signalkaskade Akt im Western Blot . . . . .	12
2.5	Antikörper zum Nachweis der Signalkaskade Erk im Western Blot . . . . .	13
2.6	Peptide . . . . .	18
2.7	TaqMan <sup>®</sup> -Primerprobes von PE Applied Biosystems . . . . .	19
2.8	Trenn- und Sammelgel für den Western Blot . . . . .	28
3.1	Effekte von VEGF-C und -D (100 ng/ml) alleine und in Kombination mit dem Kinaseinhibitor U0126 (100 $\mu$ M) auf die Proliferation (24 h) der Glial precursor cells (GPC) . . . . .	48



## Abkürzungs- und Symbolverzeichnis

APS	Ammoniumpersulfat
BSA	Bovines Serumalbumin
DAPI	4',6-Diamidino-2-phenylindol
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle Medium
DMSO	Dimethylsulfoxid
DTT	Dithiotreitol
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
ERK	extracellular regulated kinase
FCS	fetal calf serum
FIGF	c-fos-induced growth factor
FKS	Fötales Kälberserum
Flt	FMS-like tyrosine kinase 1
GAPDH	Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase
GFAP	Glial fibrillary acidic protein
GLAST	Glutamate aspartate transporter
GPC	Glial precursor cell
HEPES	4-(2-Hydroxyethyl)-piperazin-1-ethansulfonsäure
HIF-1	hypoxia-inducible factor-1
HUVEC	Human Umbilical Vein Endothelial Cells
IFN $\gamma$	Interferon $\gamma$
IL-1	Interleukin-1
Kdr	Kinase insert domain protein receptor
kb	kilobase
MEK	mitogen and extracellular kinase
NTP	Nukleosidtriphosphat
PBS	Phosphate Buffered Saline
PDGF	Platelet-derived growth factor
PDGF	platelet derived growth factor

PECAM	platelet/endothelial cell adhesion molecule
PI3K	phosphoinositide 3-kinase
PKC	protein kinase C
PLC- $\gamma$	phospholipase C-gamma
PVDF	Polyvinylidendifluorid
PlGF	placental growth factor
RNA	Ribonucleinsäure
RT-PCR	Reverse Transkriptase Polymerase Chain Reaction
RTK	receptor tyrosine kinase
Raf	apidly growing fibrosarcoma
SDS	Sodium Dodecylsulfat Polyacrylamidgelelektrophorese
TEMED	Tetramethylethylendiamin
TNF $\alpha$	Tumornekrosefaktor $\alpha$
TSH	tyreoid-stimulating hormone
Tris	Trishydroxymethylaminomethan
VEGF	Vascular endothelial growth factor
VHD	VEGF homology domain
bidest.	bidestilliert
cDNA	complementary Desoxyribonucleinsäure
kDa	Kilodalton
mRNA	messenger Ribonucleinsäure
p38MAPK	p38 mitogen-activated protein kinase

#### Lateinische Buchstaben

$i$	Laufvariable	
$N$	Anzahl	
OD	Optische Dichte	nm
Pg	Proteingehalt	
Pr	Proben	
Pu	Probenpuffermenge	$\mu$ l
$s_x$	Standardabweichung	
$\bar{x}$	Mittelwert	

---

# Kapitel 1

## Einleitung

### 1.1 Überblick

Angiogenese ist das Wachsen neuer Blutgefäße ausgehend von bereits bestehenden Gefäßen. Dieser Prozess ist wichtig für das Wachstum von neuen Blutgefäßen während der embryonalen Entwicklung und der Gewebereparatur. Das erfolgreiche Ablaufen dieses Prozesses hängt von der Balance zwischen wachstumsfördernden Faktoren und wachstumshemmenden Faktoren ab. Eine der einflussreichsten Regulatoren der Angiogenese ist der vaskuläre endotheliale Wachstumsfaktor VEGF (vascular endothelial growth factor) [15].

VEGF-A, oft nur VEGF genannt, wurde ursprünglich als ein homodimeres 34-42 kDa Protein beschrieben, das von Tumorzelllinien gebildet wurde und die Permeabilität von tumorassoziierten Blutgefäßen steigert. VEGF-A wurde deshalb ursprünglich vascular permeability factor (VPF) genannt [52]. 1989 entdeckten Ferrara und Henzel einen neuen heparin-bindenden Wachstumsfaktor für Endothelzellen in bovinen Hypophysenzellen, den sie VEGF nannten [10]. Dieses Protein war identisch zu dem zuvor charakterisierten VPF. VEGF ist ein Glycoprotein mit einem Gewicht von 45 kDa und besteht aus zwei identischen Peptidketten verbunden durch Disulfidbrücken. Wie die meisten sezernierten Proteine, werden die VEGF-Monomere im Rauen Endoplasmatischen Retikulum synthetisiert, wo eine Signalsequenz von 26 Aminosäuren abgespalten wird. Sie verbinden sich zuerst durch hydrophobe Wechselwirkungen und werden durch kovalente Disulfidbrücken verbunden, um ein Dimer zu formen, welches von den Zellen glykosyliert und sezerniert wird ohne es zu speichern [50].

### 1.2 VEGF-Familie

Die VEGF-Familie besteht aus VEGF-A (häufig nur VEGF genannt), VEGF-B, VEGF-C, VEGF-D, VEGF-E, VEGF-F und PlGF (placental growth factor)(Tabelle 1.1). Diese Glycoproteine gehören einer Superfamilie von Wachstumsfaktoren an, welche auch PDGF (platelet

derived growth factor) beinhaltet. VEGF-A ist hauptsächlich für die Angiogenese verantwortlich, während VEGF-C und -D die Lymphangiogenese kontrollieren. VEGF vermittelt seine Signale über stark bindende Tyrosinkinaserzeptoren (RTK) [39].

Tabelle 1.1: Überblick über die VEGF-Familie

VEGF-Mitglied	Rezeptoren	Funktionen
VEGF-A	VEGFR-1, VEGFR-2	Angiogenese
VEGF-B	VEGFR-1	nicht genau bekannt
VEGF-C	VEGFR-2, VEGFR-3	Lymphangiogenese
VEGF-D	VEGFR-2, VEGFR-3	Lymphangiogenese
VEGF-E	VEGFR-2	Angiogenese

### 1.2.1 VEGF-A

VEGF-A ist das am besten charakterisierte und untersuchte Peptid der VEGF-Familie. Heute sind neun Isoformen des humanen VEGF-A bekannt und untersucht, die eine Länge von 121 bis 206 Aminosäureresten in jeder Kette haben. Diese Formen entstehen nicht durch post-translationales proteolytisches Prozessieren des Proteins, sondern durch alternatives Splicen der mRNA-Vorläufer von einem einzigen VEGF-Gen. Das humane Gen ist auf dem Chromosom 6p23.1 lokalisiert, welches 14 kb umfasst und 8 Exons enthält, wobei Exon 6 und 7 unterschiedlich während der Reifung der VEGF-mRNA auftreten können [50]. Die häufigsten Isoformen bestehen aus 121, 145, 165, 189 und 206 Aminosäuren (deshalb lauten ihre Namen auch VEGF<sub>121</sub>, VEGF<sub>145</sub>, etc). Die Genexpression des VEGF ist durch verschiedene Stimuli reguliert, wie zum Beispiel Hypoxie, Wachstumsfaktoren, Transformation, p53-Mutation, Östrogen, TSH, Tumorpromoter und Stickstoffoxid (NO) [16,17].

### 1.2.2 VEGF-B

VEGF-B ist ein Heparin-bindender Wachstumsfaktor, lokalisiert auf dem Gen 11q13 [43], welcher strukturell ähnlich dem VEGF-A und PLGF ist. Dieser Faktor ist in Geweben wie dem Herzen, dem Skelettmuskel und dem Pankreas zu finden [41]. Durch alternatives Splicen existieren zwei Isoformen des VEGF-B (VEGF-B<sub>167</sub> und VEGF-B<sub>186</sub>) [56]. VEGF-B bindet ausschließlich an VEGFR-1. Dieser Aktivierung des Rezeptors folgt ein schwacher mitogener Effekt auf Endothelzellen [38]. Die Bedeutung des VEGF-B ist bisher nicht genau bekannt.



### 1.2.3 VEGF-C und VEGF-D

VEGF-C und VEGF-D sind in Struktur und Funktion sehr ähnlich zueinander, deshalb wird beiden Faktoren in dieser Arbeit besonders Beachtung geschenkt, weshalb deren Beschreibung ausführlich zusammen geschieht.

VEGF-C wurde zum ersten Mal 1996 von Joukov et al. beschrieben und enthält eine Region, die ca. 30 % Aminosäuregleichheit mit VEGF-A<sub>165</sub> hat [21].

Der „Vascular Endothelial Growth Factor-D“ (VEGF-D) wurde zuerst in der Maus entdeckt und als c-fos-induced growth factor (FIGF) beschrieben, welcher einen mitogenen Effekt auf Fibroblasten hat [42]. Yamada et al. entdeckten kurze Zeit darauf diesen Faktor im Menschen, den sie als VEGF-D bezeichneten, basierend auf seiner strukturellen Ähnlichkeit zur VEGF-Familie der Wachstumsfaktoren [66].

Vom strukturellen Standpunkt aus hängt VEGF-D (lokalisiert auf Gen 4q34 [43]) am nächsten mit VEGF-C (lokalisiert auf Gen Xp22.31 [43]) zusammen. Tatsächlich zeigen die Ähnlichkeiten in der gesamten Struktur und der Rezeptorbindung an, dass VEGF-C und VEGF-D eine Unterfamilie innerhalb der vaskulären Wachstumsfaktoren bilden. Die primären Translationsprodukte dieser beiden Wachstumsfaktoren bestehen aus einer zentralen VEGF homology domain (VHD), welche den zentralen Cystinknoten umfassen, und aus einer N- und C-terminalen Region, die nicht in anderen VEGF-Mitgliedern zu finden ist. Das VHD von VEGF-C und VEGF-D teilen 61 % Aminosäuregleichheit miteinander und 30 % mit anderen Mitgliedern der VEGF-Familie [2]. Die Verarbeitung von VEGF-C und -D-Propeptiden beginnt intrazellulär und wird nach der Sekretion fortgesetzt (Abbildung 1.1). Die Proteine verbinden sich zu antiparallelen Homodimeren, die durch zwei Schwefelbrücken verbunden sind, die anschließend proteolytisch gespalten werden. Die C-terminale Region wird entweder spät auf dem extrazellulären Weg entfernt oder schon kurz nach der Sekretion, wie die N-terminalen Propeptide [21]. In diese Spaltvorgänge sind viele Mediatoren involviert, wie zum Beispiel die Proteasen Furin, PC5 und PC7, welche die Propeptide vom VEGF-C entfernen [55], aber auch Plasmin, welches VEGF-D bearbeitet [34]. Die proteolytische Trennung der VHDs kennzeichnet VEGF-C und -D und unterscheidet sie dadurch vom Rest der VEGF-Familie. Diese VHD-Dimere sind Liganden, die mit hoher Affinität an die Rezeptoren VEGFR-2 und VEGFR-3 binden [2]. Der Grad der Veränderung des VEGF-C verändert auch die Rezeptorspezifität des Proteins: Die späte voll-prozessierte Form bindet VEGFR-2 und VEGFR-3 mit hoher Affinität, während die frühe unreife Form des VEGF-C ausschließlich VEGFR-3 bindet. Im Gegensatz dazu bindet VEGF-D sowohl unprozessiert kurz nach der Sekretion extrazellulär als auch in prozessierter Form VEGFR-2 und -3, wobei auch hier die Affinität zu den Rezeptoren mit der Reife des Faktors steigt. Dieser Unterschied eröffnet die Möglichkeit, die Bindung an die Rezeptoren und somit die Weiterleitung von Signalen über die verschiedenen Reifungsstufen der Proteine zu steuern [58]. Das prozessierte murine VEGF-D dagegen aktiviert ausschließlich den murinen

Rezeptor VEGFR-3 und nicht VEGFR-2, gleicht dem humanen VEGF-D aber ansonsten zu 83 % [3].

### Reifung des VEGF-D

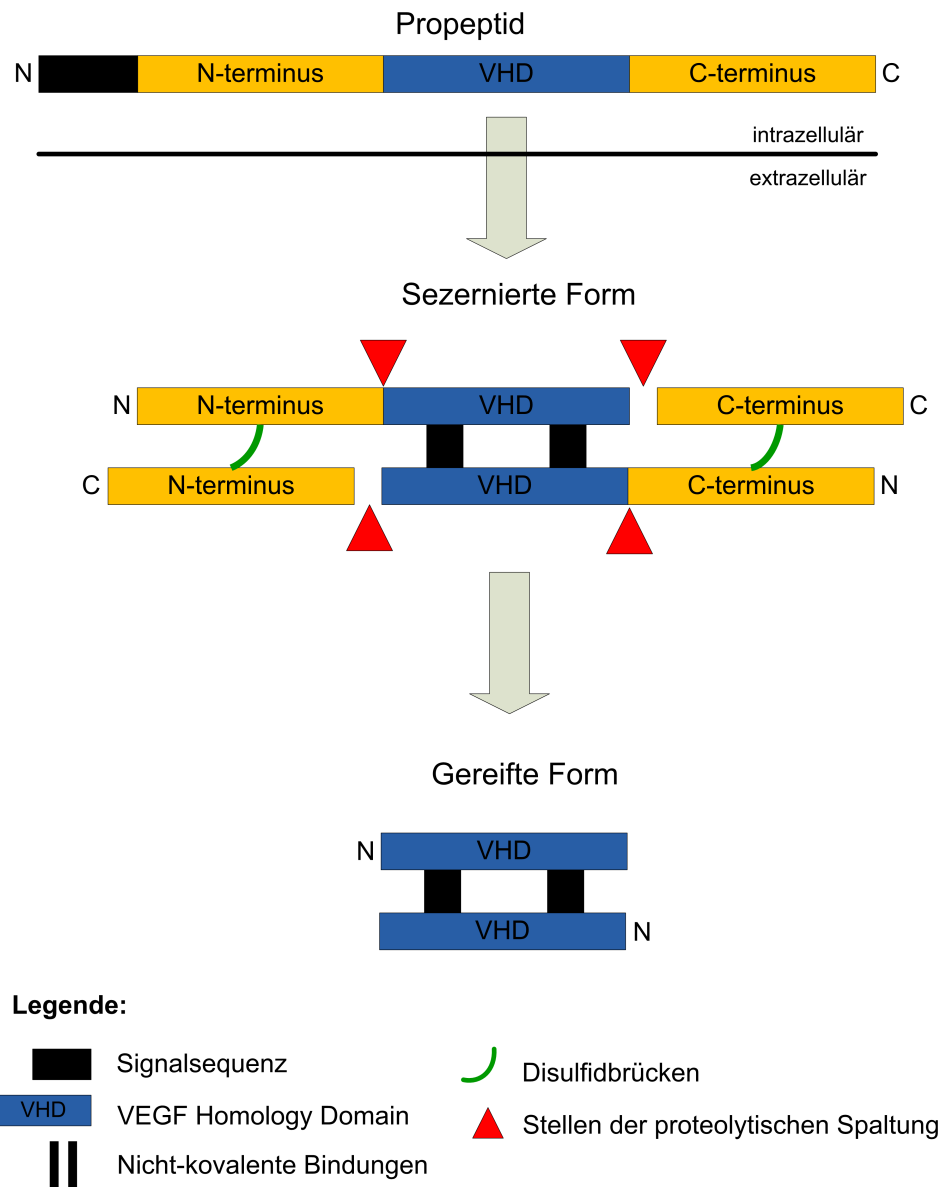


Abbildung 1.1: Schematische Darstellung der proteolytischen Reifung des VEGF-D

#### 1.2.4 VEGF-E

VEGF-E ist ein weiteres Mitglied der VEGF-Familie, welches im Genom des Orf-Virus aus der Gattung Parapox entdeckt wurde [29]. VEGF-E ist der Sammelbegriff für fünf Untergruppen des Proteins. Alle Varianten binden und aktivieren VEGFR-2, nicht aber VEGFR-1 oder -3 [23, 36, 65].

#### 1.2.5 VEGF-F

Erst kürzlich wurde ein neues Mitglied der VEGF-Familie, VEGF-F, im Schlangengift der Viper entdeckt. Es besteht aus den VEGF-ähnlichen Proteinen Vammin und VR-1. Es bindet ausschließlich an VEGFR-2 [59].

#### 1.2.6 PlGF

PlGF (placenta growth factor) wurde 1991 von Maglione et al. in der menschlichen Plazenta entdeckt [31]. PlGF wird zusätzlich zur Plazenta in Herz, Lunge, Schilddrüse und im Skelettmuskel gebildet [48] und bindet ausschließlich an VEGFR-1 [46]. Alternatives Splicen ergibt wiederum fünf verschiedene Isoformen (PlGF-1 bis PlGF-4) [5, 30, 67], auf die hier nicht weiter eingegangen wird.

### 1.3 VEGF-Rezeptoren

Ursprünglich wurden VEGF-Bindungsstellen auf der Zelloberfläche von vaskulären Endothelzellen in vitro [63] und in vivo [18, 19] gefunden. Anschließend wurde gezeigt, dass die VEGF-Rezeptoren ebenfalls auf aus Knochenmark abgeleiteten Zellen wie Monozyten vorkommen [53]. Es sind drei Rezeptoren der VEGF-Familie bekannt (Abbildung 1.2).

#### 1.3.1 VEGFR-1

VEGFR-1 (fms-like tyrosine kinase; Flt-1) besteht aus sieben extrazellulären Immunglobulin-Domänen, einer transmembranen Region und einer intrazellulären Tyrosinkinase-Region [54]. VEGFR-1 ist ein 180 kDa Rezeptor für VEGF-A, VEGF-B und PlGF. Während der embryonalen Entwicklung wird VEGFR-1 zuerst in Endothelzellen gebildet [49], außerdem im adulten Stadium unter anderen in Osteoblasten, Monozyten/Makrophagen, hämatopoetischen Stammzellen und Trophoblasten der Plazenta. VEGFR-1 ist ein negativer Regulator der Angiogenese während der Entwicklung, spielt eine wichtige Rolle für die Angiogenese unter pathologischen Voraussetzungen [11] und ist bei der Migration von Monozyten/Makrophagen eingebunden. Es

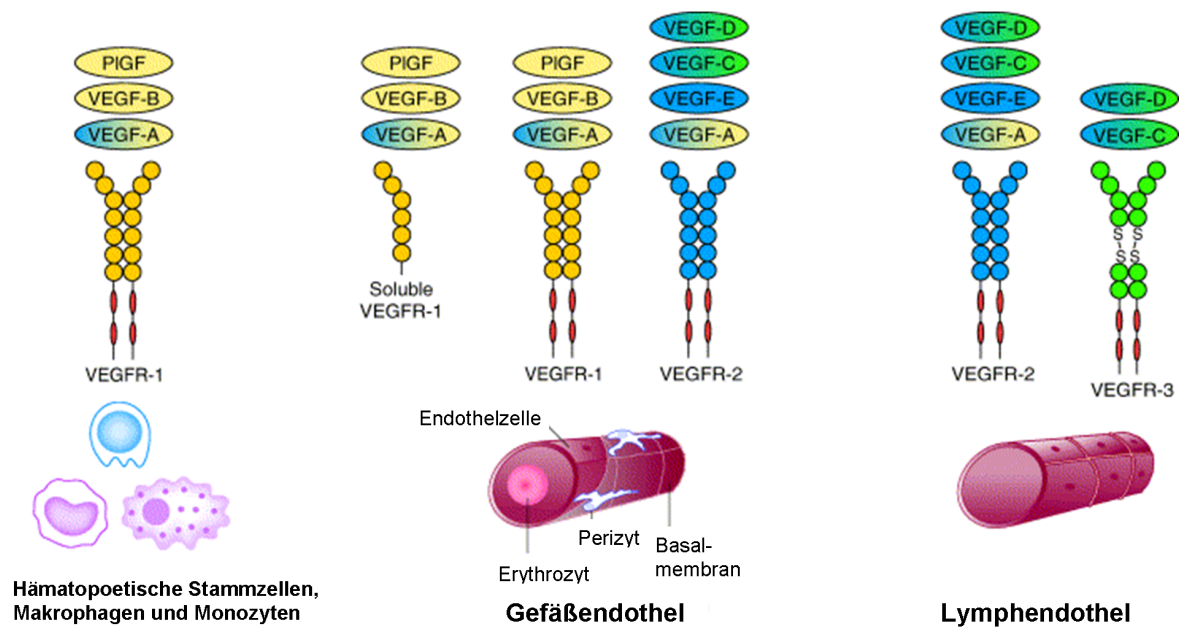


Abbildung 1.2: Schematische Darstellung der VEGF-Rezeptoren mit ihren Liganden. VEGFR-1 und seine Liganden sind gelb, VEGFR-2 und seine Liganden blau und VEGFR-3 und seine Liganden sind grün. Liganden, die in zwei Farben coloriert sind, binden an mehrere Rezeptoren [6].

existiert zusätzlich noch eine durch alternatives Splicing hergestellte lösliche Form des VEGFR-1. sVEGFR-1 (soluble VEGFR-1) hemmt die VEGF-A-Aktivität und wird in Zusammenhang mit Tumoren und Ischämie beschrieben [22].

### 1.3.2 VEGFR-2

VEGFR-2 (KDR, human; Flk-1, murin) ist ein 200-230 kDa Rezeptor, der erstmals 1991 entdeckt wurde [61]. Wie VEGFR-1 besteht er aus einer extrazellulären Region mit sieben Ig-Domänen, einer transmembranen Domäne und einer Tyrosinkinase-Region aufgebaut aus ungefähr 70 Aminosäuren. VEGFR-2 bindet VEGF-A, VEGF-C, VEGF-D und VEGF-E und wird sowohl in vaskulären Endothelzellen als auch in lymphozytären Endothelzellen gebildet. Zusätzlich ist bekannt, dass VEGFR-2 in verschiedenen anderen Zelltypen wie zum Beispiel Neuronen, Megakaryozyten und hämatopoetischen Stammzellen existiert [32]. VEGFR-2 ist vermutlich der Hauptvermittler von vielen physiologischen und pathologischen Effekten von VEGF-A auf Endothelzellen. Dieses schließt Proliferation, Überleben, Migration und Permeabilität mit ein. Die Bindung von VEGF an VEGFR-2 führt zu einer Dimerisierung und Auto-phosphorylierung des Rezeptors und startet eine intrazelluläre Signalkaskade. Beispielsweise wird die Proliferation über die Erk-Signalkaskade (extracellular regulated kinase) aktiviert, welche zur Gentranskription führt [60] (Abbildung 1.4).

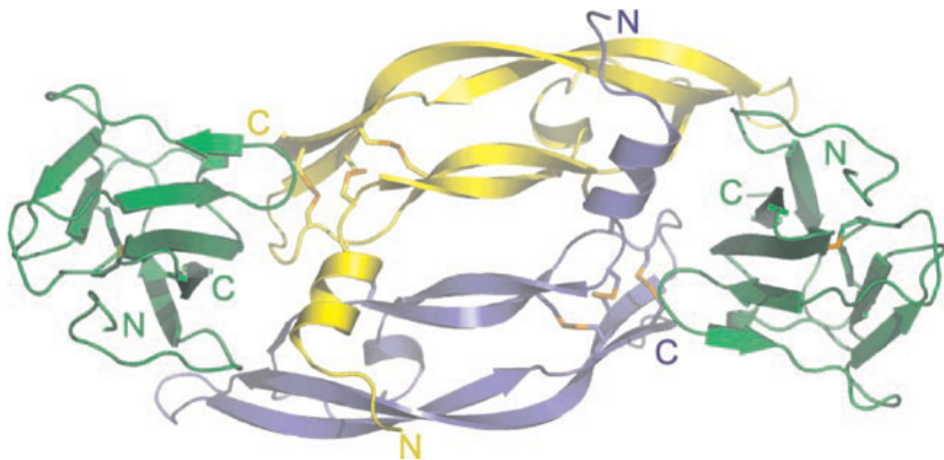


Abbildung 1.3: Kristallstruktur des VEGF/VEGFR-Komplexes. Die zwei VEGF-Monomere sind in blau und gelb dargestellt, die beiden Rezeptormoleküle in grün (Abbildung aus [9]).

### 1.3.3 VEGFR-3

VEGFR-3 (Flt-4) ist ein 195 kDa Rezeptor, der aus zwei Teilen aufgebaut ist: Durch proteolytische Spaltung in der fünften Ig-Schleife wird VEGFR-3 in einen 120 kDa und einen 75 kDa

Teil getrennt, welche über eine Schwefelbrücke miteinander verbunden sind [28]. VEGFR-3 bindet VEGF-C und VEGF-D und es gibt zwei Splicevarianten im Menschen. Dieser Rezeptor ist vorallem in vaskulären Tumoren verbreitet und kann als eine Art Marker der endothelialen Zelldifferenzierung angesehen werden [47]. Darüberhinaus wird VEGFR-3 mit kurzfristiger Lymphangiogenese in der Wundheilung in Verbindung gebracht. VEGFR-2 und VEGFR-3 kooperieren bei der Lymphgefäßbildung. Folglich spielt VEGFR-3 eine große Rolle in der kardiovaskulären Entwicklung und Remodellierung des primären vaskulären Geflechts während der Embryogenese, außerdem verstärkt es die Lymphangiogenese im Erwachsenenalter [45]. Die VEGFR-3-Signaltransduktion ist immernoch relativ unerforscht. Makinen et al. fanden heraus, dass VEGFR-3 die Proliferation, Migration und das Überleben von lymphatischen Endothelzellen induziert [37]. Die Signalstärke des VEGFR-3 wird direkt durch einen heterodimeren Komplex mit VEGFR-2 beeinflusst [8].

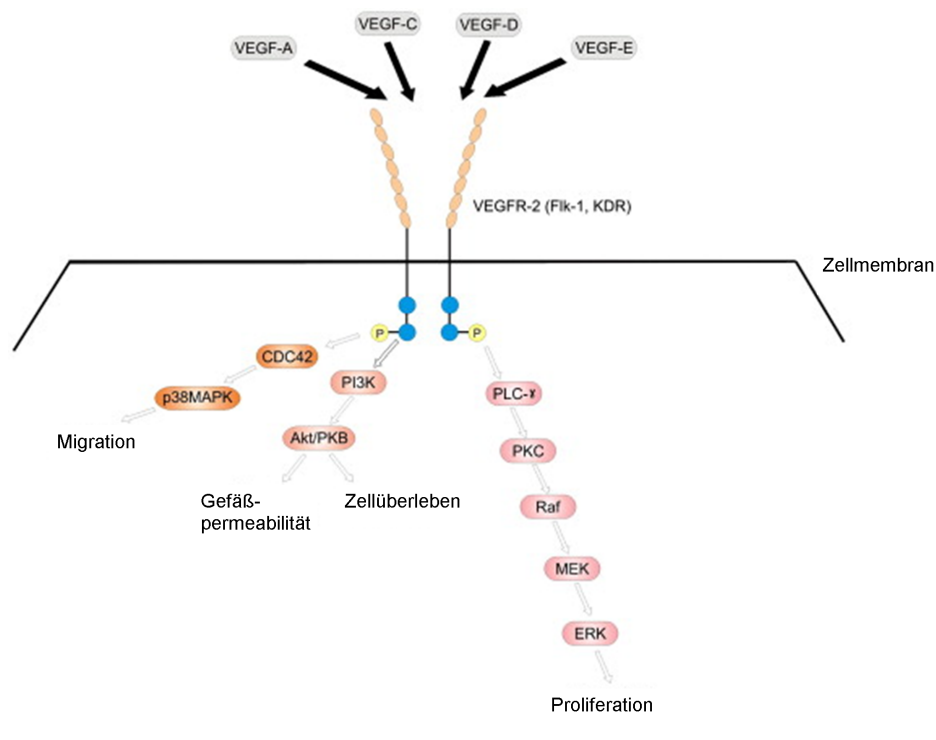


Abbildung 1.4: Darstellung verschiedener VEGFR-2-Signalkaskaden nach Bindung der Wachstumsfaktoren.

Abkürzungen: Akt/PKB, protein kinase B; CDC42, cell devision cycle; ERK, extracellular regulated kinase; MEK, mitogen and extracellular kinase; p38MAPK, p38 mitogen-activated protein kinase; PI3K, phosphoinositide 3-kinase; PKC, protein kinase C, PLC- $\gamma$ , phospholipase C-gamma; Raf, rapidly growing fibrosarcoma [43]

## 1.4 Die Rolle des VEGF während der Gehirnentwicklung

Im Gehirn sind der Wachstumsfaktor VEGF-A und die Rezeptoren VEGFR-1 und -2 am besten untersucht. VEGF-A wird von Neuronen und Astrozyten gebildet und induziert vielfältige Effekte in verschiedenen Zelltypen des Zentralen Nervensystems, z.B. in Microgliazellen, wo VEGF-A die Chemotaxis und die Proliferation induziert [4, 12, 51]. Es spielt sowohl parakrin als auch autokrin eine Rolle in der Aufrechterhaltung der vaskulären Homöostase und reagiert bei zellulärer Hypoxie mit einer erhöhten Expression und führt somit zu einer heraufgesetzten Angiogenese [40]. Weiterhin wurde in kultivierten murinen Spinalganglien gezeigt, dass im peripheren Nervensystems VEGF-A ein neurotropher Faktor ist, der den axonalen Auswuchs stimuliert, das Zellüberleben erhöht und die Schwannzell-Proliferation steigert [57].

Im Gegensatz zu VEGF-A ist erst wenig über das Auftreten und die Funktionen von VEGF-C und VEGF-D und ihrem Rezeptor VEGFR-3 im Zentralen Nervensystem bekannt. Le Bras et al. untersuchten 2006 die Rolle des VEGF-C für neurale Progenitorzellen im embryonalen Gehirn und fanden heraus, dass es sowohl im Gehirn von *Xenopus laevis*-Embryos, dem Glatten Krallenfrosch, als auch in Mausgehirnen exprimiert wird. Außerdem wurde gezeigt, dass der VEGF-C-Rezeptor VEGFR-3 von neuronalen Zellen im embryonalen Gehirn gebildet wird. VEGF-C wird in situ in radialer Astroglia (GLAST<sup>+</sup>) und in Astrozyten-Precursor-Zellen (GFAP<sup>+</sup>) produziert. Der Rezeptor VEGFR-3 findet sich an verschiedenen Oligodendrozyten-Precursor-Zellen (A2B5<sup>+</sup>, Olig2<sup>+</sup>, PDGF $\alpha$ <sup>+</sup>) und Nestin<sup>+</sup>-neuronalen Precursorzellen. Auch die Proliferation von neuronalen Progenitorzellen wird durch die Anwesenheit von VEGF-C und VEGFR-3 geregelt und induziert. Dies wurde anhand des embryonalen murinen Sehnerven untersucht, wobei ein Fehlen von VEGF-C eine verminderte Zahl an Oligodendrozyten-Vorläuferzellen hervorrief [26]. Trotz fehlender lymphatischer Gefäße werden VEGF-C, VEGF-D und VEGFR-3 in einigen Hämangioblastomen und Glioblastomen gebildet [7, 20].

## 1.5 Fragestellung

Die Effekte der Wachstumsfaktoren in Bezug auf das Gehirn während der embryologischen Entwicklung sind bisher noch wenig erforscht. Vorallem den beiden erst kürzlich entdeckten Faktoren VEGF-C und VEGF-D können bisher kaum eine Bedeutung im embryonalen Gehirn zugeschrieben werden. Erst 2006 wurde entdeckt, dass VEGF-C und sein Rezeptor VEGFR-3 wichtige Faktoren für neurale Vorläuferzellen sind, die unter anderem deren Proliferation steuern [26]. Über den Lymphangiogenesefaktor VEGF-D gibt es dagegen kaum Untersuchungen in Bezug auf die verschiedenen Zellen des ZNS.

In dieser Arbeit werden folgende Fragestellungen behandelt:

1. Welche Zellen im murinen Gehirn exprimieren die Wachstumsfaktoren VEGF-C, VEGF-D und deren Rezeptor VEGFR-3? Untersucht werden dabei unter anderem Neurone, Oligodendrozyten, Microgliazellen und A2B5<sup>+</sup>-Glial precursor cells. Zusätzlich wird in der Arbeit ein Vergleich zu VEGF-A und den Rezeptoren VEGFR-1 und -2 hergestellt.
2. Werden diese Faktoren und Rezeptoren auch in verschiedenen Gewebeproben des murinen Gehirns gebildet? Als Gehirnproben liegt Material des achten Embryonaltages und des 18. postnatalen Tages vor, sowie Gewebe des adulten (3 Monate alten) Tieres.
3. Werden VEGF-C und VEGF-D, sowie VEGFR-3 durch verschiedenen Zytokine und Wachstumsfaktoren reguliert? Dieses wird anhand von Zellen durchgeführt, die vorher u.a. mit IFN $\gamma$ , TNF $\alpha$ , IL-1 oder VEGF-A stimuliert wurden.
4. Für funktionelle Studien muss ein Zellmodell gefunden werden, welches VEGF-C und -D, sowie VEGFR-3 in hoher Anzahl exprimiert.
5. Was sind die Effekte der VEGF-C und -D-Expression? Welche Signalkaskaden folgt der Bindung an ihren Rezeptor VEGFR-3?
6. Desweiteren wird die funktionelle Aktivität der Wachstumsfaktoren VEGF-C und -D in Hinsicht auf die Proliferationsregulation und die Migrationsfähigkeit untersucht.



---

## Kapitel 2

# Material und Methoden

## 2.1 Materialien

### 2.1.1 Antikörper

#### 2.1.1.1 Antikörper für die Immuncytochemie

Tabelle 2.1: Antikörper zum immuncytochemischen Nachweis von VEGF Rezeptor Typ 1 (VEGFR-1)

	Primärantikörper	Sekundärantikörper
<b>Antikörper</b>	anti-Flt-1 (VEGFR-1)	Alexa Fluor® 488 anti-Maus
<b>Verdünnung</b>	1:100	1:1000
<b>Herkunft</b>	Kaninchen, polyklonal	Ziege, polyklonal
<b>Firma</b>	Santa Cruz, USA	Invitrogen
<b>Bestellnummer</b>	sc-316	A31619

Tabelle 2.2: Antikörper zum immuncytochemischen Nachweis von VEGF Rezeptor Typ 2 (VEGFR-2)

	Primärantikörper	Sekundärantikörper
<b>Antikörper</b>	anti-mKdr (VEGFR-2) goat IgG	Alexa Fluor® 555 anti-Ziege
<b>Verdünnung</b>	1:100	1:1000
<b>Herkunft</b>	Ziege	Esel, polyklonal
<b>Firma</b>	R&D Systems	Invitrogen
<b>Bestellnummer</b>	AF644	A21432

Tabelle 2.3: Antikörper zum immuncytochemischen Nachweis von VEGF Rezeptor Typ 3 (VEGFR-3)

	Primärantikörper	Sekundärantikörper
<b>Antikörper</b>	anti-mFlt-4 (VEGFR-3) goat IgG	Alexa Fluor <sup>®</sup> 555 anti-Ziege
<b>Verdünnung</b>	1:100	1:1000
<b>Herkunft</b>	Ziege	Esel, polyklonal
<b>Firma</b>	R&D Systems	Invitrogen
<b>Bestellnummer</b>	AF743	A21432

#### 2.1.1.2 Antikörper für den Western Blot

Tabelle 2.4: Antikörper zum Nachweis der Signalkaskade Akt im Western Blot

	Primärantikörper	Sekundärantikörper
<b>Antikörper</b>	anti-pAkt(Ser473)	anti-Kaninchen IgG HRP-conjugated
<b>Spezifität</b>	Mensch, Maus, Ratte	
<b>Verdünnung</b>	1:250	1:20.000
<b>Herkunft</b>	Kaninchen, polyklonal	Ziege, polyklonal
<b>Firma</b>	Cell Signaling Technology	DAKO
<b>Bestellnummer</b>	#9271S	P0260
<b>Antikörper</b>	anti-Akt	anti-Kaninchen IgG HRP-conjugated
<b>Spezifität</b>	Mensch, Maus, Ratte	
<b>Verdünnung</b>	1:500	1:20.000
<b>Herkunft</b>	Kaninchen, polyklonal	Ziege, polyklonal
<b>Firma</b>	Cell Signaling Technology	DAKO
<b>Bestellnummer</b>	#9272	P0260

Tabelle 2.5: Antikörper zum Nachweis der Signalkaskade Erk im Western Blot

	<b>Primärantikörper</b>	<b>Sekundärantikörper</b>
<b>Antikörper</b>	anti-Erk (Thr202/Tyr204)	anti-Kaninchen IgG HRP-conjugated
<b>Spezifität</b>	Mensch, Maus, Ratte	
<b>Verdünnung</b>	1:500	1:20.000
<b>Herkunft</b>	Kaninchen, polyklonal	Ziege, polyklonal
<b>Firma</b>	Cell Signaling Technology	DAKO
<b>Bestellnummer</b>	#9101S	P0260
<b>Antikörper</b>	anti-Erk2	anti-Kaninchen IgG HRP-conjugated
<b>Spezifität</b>	Mensch, Maus, Ratte	
<b>Verdünnung</b>	1:500	1:20.000
<b>Herkunft</b>	Maus, monoklonal	Ziege, polyklonal
<b>Firma</b>	Santa Cruz Biotechnology	DAKO
<b>Bestellnummer</b>	sc-1647	P0260

### 2.1.2 Biochemikalien

<b>Chemikalie</b>	<b>Firma</b>
Aceton	Roth
Acrylamid/Bis-Lösung, 30%	Serva
APS	Roth
Bio-Rad Protein-Assay	BIO-RAD Laboratories GmbH
Bromphenolblau	Merck
BSA	Biomol
Chloroform	Merck
DAPI	Sigma-Aldrich
DMEM	
mit 4500mg/l Glucose, 4mM L-Glutamin, 25mM HEPES	Gibco (Invitrogen)
DMSO	Sigma-Aldrich
DTT	Biomol
dNTP-Mix	Fermentas GmbH
EDTA	Merck
EDTA-Stopp-Lösung	Promega
Ethanol	Roth
FKS	PAA Laboratories GmbH
Glycerin	Merck
Glycin	Roth
HEPES	Merck
Immunomount	Thermo Shandon
Isopropanol	Roth
Methanol	Roth
Natriumchlorid	Roth
Penicillin/Streptomycin	Gibco
Proteinmarker	Fermentas
Random Hexamer Primer	Amersham Biosciences
Reaction Buffer	Fermentas GmbH
TEMED	Roth
Tris	Sigma-Aldrich
Triton-X-100	Merck
Trizol	Invitrogen
Tween	Fluka
Vanadat	Fluka

### 2.1.3 Enzyme

Enzym	Firma
DNase-freie RNase	Sigma
Reverse Transkriptase	Fermentas GmbH
RNase-freie DNase	Promega

### 2.1.4 Gebrauchsfertige Kits

Kit	Firma
CyQUANT® Cell Proliferation Assay Kit C-7026	Molecular Probes
ECL Advance™ Western Blotting Detection Kit	Amersham Biosciences
TaqMan® Universal Master Mix	PE Applied Biosystems

### 2.1.5 Geräte

Gerät	Firma
ABI Prism®-770 SDS Real-Time-PCR-Gerät	PE Applied Biosystems
Elektrophoresekammer	Amersham Pharmacia Biotech
F-2000 Fluoreszenzspektrometer	Hitachi
Filmkassette Hypercassette™	Biometra
Kühlzentrifuge	Eppendorf
Magnetrührer MR2000	Heidolph
Mikroskop, invers CK2	Olympus
Mikroskop, konfokal, invers, Axiophot	Zeiss
Schüttler	Gerhard
Thermocycler T-Gradient	Biometra
Tischzentrifuge Biofuge pico	Heraeus
Trans-Blot Semi-Dry Transfer Cell	BIO-RAD Laboratories GmbH
Vortex-Mixer VF2	Janke&Kunkel
Waage	Sartorius

### 2.1.6 Hemmstoffe

Hemmstoff	Firma
U0126	Biomol

### 2.1.7 Medien, Lösungen und Puffer

#### 2.1.7.1 Medien

**Glial precursor cell-Medium (Standard-Nährmedium):** DMEM mit 4500 mg/l Glucose, 4 mM L-Glutamin, 25 mM HEPES, ohne Pyruvat

- 515 ml DMEM
- 59,99 ml (10 %) FKS
- 5,99 ml (1 %) Penicillin/Streptomycin
- 17,96 ml (3 %) L-Glutamin

**Stimulationsmedium, serumfrei:** wie Standard-Nährmedium, ohne FKS, dafür 0,1 % BSA

**Stimulationsmedium, 0,2 %FKS:** wie Standard-Nährmedium, mit 0,2 %, statt 10 % FKS

#### 2.1.7.2 Lösungen& Puffer

##### Zellkultur:

**DNase-Lösung:** 1mg DNase in 5 ml Aqua bidest., steril filtriert

**PBS, pH 7,2-7,3:**

- 8,0 g NaCl (136 mM)
- 0,2 g KCl (2,7 mM)
- 0,24 mg  $\text{KH}_2\text{HPO}_4$  (1,8 mM)
- 1,44 g  $\text{Na}_2\text{HPO}_2 \cdot 2 \text{H}_2\text{O}$  (8 mM)

auf einen Liter mit destilliertem Wasser auffüllen, danach autoklavieren.

##### Proliferationsversuch:

**RNase-Lösung:** 10 mg DNase-freie RNase in 1 ml  $\text{H}_2\text{O}$  bidest. gelöst (0,8 U/ $\mu\text{l}$ )

**Western Blot:**

**Lysis-Puffer, pH 7,8:**

- 50 mM Tris
- 100 mM NaCl
- 5 mM EDTA
- 1 % Triton-X-100
- 2 mM Vanadat

**Probenpuffer:**

- 0,23 g SDS
- 1,25 ml Gelpuffer I
- 1 ml Glycerin
- 20 mM DTT
- 7,25 ml Aqua dest.

**Gelpuffer I, pH 8,8:**

- 1,5 mM Tris/HCl
- 0,4 % SDS

**Gelpuffer II, pH 6,9:**

- 0,5 mM Tris/HCl
- 0,4 % SDS

**Elektrodenpuffer, pH 8,2–8,3:**

- 12,16 g Tris
- 57,6 g Glycin
- 4 g SDS
- ad 4l Aqua dest.

**Transferpuffer, pH 9:**

- 25 mM Tris
- 192 mM Glycin
- 10 % Methanol

**TBS-T (Tris-Buffered Saline Tween), pH 7,5:**

- 550 mM Tris
- 150 mM NaCl
- 1 mM EDTA
- 0,1 % Tween

**2.1.8 Peptide**

Tabelle 2.6: Peptide

Peptid	Firma
recombinant mouse VEGF-C	RELIATech, Deutschland
recombinant mouse VEGF-C <sub>152S</sub>	RELIATech, Braunschweig
recombinant rat VEGF-D	R&D Systems, Minneapolis, MN, USA
recombinant mouse VEGF-A <sub>165</sub>	PeproTech, Rocky Hills, NJ, USA
andere murine Zytokine und Wachstumsfaktoren	Immunotools, Friesoythe, Deutschland



### 2.1.9 TaqMan-Primerprobes

Tabelle 2.7: TaqMan®-Primerprobes von PE Applied Biosystems

Primer	ID-Nummer	Sequenz
mGAPDH	Mm99999915_g1	CGGTGTGAACGGATTTGGCCGTATT
mVEGF-A	Mm00437304_m1	ACCATGCCAAGTGGTCCCAGGCTGC
mVEGF-C	Mm00437313_m1	AGCAACATTACCACAGTGTCTCAGGCA
mVEGF-D	Mm00438965_m1	GCCTGGGACAGAAGACCACTCTTAC
mVEGFR-1	Mm00438980_m1	TCACCGTGCAAGGAACCTCAGACAA
mVEGFR-2	Mm00440099_m1	AATAGAAGGTGCCCAGGAAAAGACC
mVEGFR-3	Mm00433337_m1	CCCAGCGCAGCCTCCGGAGGCGGCA
hGAPDH	Hs99999905_m1	GGGCGCCTGGTCAACAGGGCTGCTT
hVEGF-C	Hs00153458_m1	TACCACAGTGTCTCAGGCAGCGAACAA
hVEGF-D	Hs00189521_m1	CTGAAGAAGATCGCTGTTCCCATTC
hVEGFR-2	Hs00176676_m1	AATAGAAGGTGCCCAGGAAAAGACG
hVEGFR-3	Hs00176607_m1	GGCAGTGCCCGGCTGCCCCTGAAGT

### 2.1.10 Verbrauchsmaterial

Material	Firma
Blot Paper extra thick	BIO-RAD Laboratories GmbH
Deckgläschen	Assistent
Hyperfilm™EC1	Amersham Biosciences
Kulturflaschen	Sarstedt
PCR-Tubes 0,2 ml	Sarstedt
Petrischalen 35 mm	TPP
Petrischalen 35 mm	Nunc
PVDF Transfer Membrane Hybond-P	GE Healthcare Life Sciences
Realtime-RT-PCR-Platten	Sarstedt
Zellschaber	TPP

### 2.1.11 Zellmaterial

- *murine Zellkulturen und Gewebeproben*: C57B6 J mice (Charles River, Les Oncins, Frankreich)
- *murine Gehirnprouben*: von E18, P6 und adulten (3 Monate alten) Mäusen

- *bEND Maus Endotheliomazellen, Neuro2a Maus Neuroblastomzellen und murine Schwannomazellen*: European Collection of Cell Cultures ECACC (Salisbury, UK)
- *immortalisierte BV-2 murine Microgliazellen*: Elisabetti Blasi (University of Perugia, Italien)
- *murine Oligodendrozyten*: J. Trotter (Heidelberg, Deutschland)

## 2.2 Methoden

### 2.2.1 Realtime-RT-PCR

#### 2.2.1.1 Überblick

Die Realtime-Reverse Transkriptase-Polymerasekettenreaktion (Realtime-RT-PCR) beruht auf der indirekten Quantifizierung der mRNA-Menge eines Gens. Die Ergebnisse dieser Methode lassen eine quantitative Aussage über die Expression des zu untersuchenden Gens in stimulierten oder unstimulierten Zellpopulationen oder Geweben zu. Um die ersten Schritte der Realtime-RT-PCR durchführen zu können, muss vorher eine RNA-Isolierung aus den Zellen bzw. Geweben stattfinden, damit diese mit Hilfe des Enzyms Reverse Transkriptase in DNA, sogenannter complementary DNA (cDNA) umgeschrieben werden kann. Die RNA-Isolierung aus zuvor kultivierten Zellen wird mit der Trizol-Standardmethode erreicht, deren Schritte sich in Phasentrennung, RNA-Präzipitation, Waschen, Trocknen und Rehydrierung unterteilen. Nach der Bestimmung des RNA-Gehalts durch Photometrie kann die zuvor gewonnene RNA in cDNA umgewandelt werden. Die Proben werden zuvor von eventuell enthaltenen DNA-Rückständen durch eine DNase entfernt. Nach Gewinnung der cDNA kann mit der eigentlichen Realtime-RT-PCR begonnen werden. Das Prinzip der Polymerase-Kettenreaktion beruht auf der enzymatischen Synthese bestimmter DNA-Sequenzen. Bei jeder PCR laufen immer die folgenden drei Schritte ab:

- **Denaturierung:** Trennung der doppelsträngigen DNA
- **Annealing:** Anlagerung der komplementären Primer an ihre bestimmten Bindungsstellen an beide Stränge der DNA; der Primer dient als Startpunkt für eine DNA-Polymerase.
- **Elongation:** Die DNA-Polymerase kann durch Desoxynuklotide einen zu cDNA komplementären Strang bilden.

Dieser Vorgang läuft wiederholt ab, so dass es zu einer exponentiellen Vermehrung der DNA kommt. Bei der hier verwendeten Methode kommen die TaqMan<sup>®</sup>-Sonden zum Einsatz.

TaqMan<sup>®</sup>-Sonden sind kurze DNA-Stücke, die am 5'-Ende einen fluoreszierenden Reporterfarbstoff besitzen und am 3'-Ende einen Quencher. Quencher sind Farbstoffe, die die Fluoreszenz von Farbstoffen in ihrer Nähe inaktivieren. Wenn die PCR begonnen hat, können die TaqMan<sup>®</sup>-Polymerasen die TaqMan<sup>®</sup>-Sonden bei der Verdoppelung der cDNA-Vorlage abbauen. Somit wird der Reporterfarbstoff frei und ist nicht mehr im Einflussbereich des Quenchers. Daraufhin wird die Fluoreszenz ausgelöst und messbar. Da diese Fluoreszenz immer - also während der kompletten PCR - detektierbar ist, nennt man diese Form der Polymerasekettenreaktion Realtime-RT-PCR, d.h. Echtzeit-PCR.

#### 2.2.1.2 RNA-Isolierung durch die Trizolstandardmethode

Das Grundprinzip der RNA-Isolierung beruht auf Lyse der Zelle, der Inaktivierung der RNasen und der Isolation der RNA daraus. Vor der RNA-Gewinnung aus den Zellen werden diese in Kulturflaschen für zwei Tage kultiviert und anschließend zweimal eine Stunde mit serumfreien Medium vorinkubiert. Die Stimulation erfolgt danach über 24 Stunden im Stimulationsmedium. Anschließend folgen zwei Spülungen mit kaltem PBS und nach der Ernte mit jeweils 1 ml Trizol pro Flasche werden die Zellen in sterile Reaktionsgefäße überführt.

**Phasentrennung:** Die Zelhomogenate werden 10 Minuten bei 12000xg und 4 °C zentrifugiert. Der Überstand wird in ein neues Reaktionsgefäß pipettiert, das Pellet wird verworfen. Den Überstand lässt man 5 Minuten bei Raumtemperatur stehen, anschließend wird er mit 200 µl Chloroform überschichtet, 15 Sekunden von Hand geschüttelt und 15 Minuten mit 12000xg bei 4 °C zentrifugiert.

**RNA-Präzipitation:** 600 µl der oberen Phase (ca. 60% des ursprünglichen Trizol-Reagenz) werden abpipettiert und in ein neues Gefäß überführt. Dazu werden 500 µl Isopropanol gegeben und durch 15 Sekunden langes Umschütteln vermischt. Nach 10minütiger Inkubation bei Raumtemperatur erfolgt wieder eine Zentrifugation bei 12000xg und 4 °C für weitere 10 Minuten.

**Waschen der RNA:** Nach dem Zentrifugieren wird der Überstand verworfen und anschließend das gelartige Sediment mit 1 ml 75 %igem Ethanol versetzt und kurz geschüttelt. Nach erneuter Zentrifugation für 5 Minuten bei 7500xg und 4 °C wird wiederum der Überstand verworfen, so dass nur noch ein Pellet zurückbleibt.

**Trocknung und Rehydrierung der RNA:** Das so eben gewonnene RNA-Pellet wird bei Raumtemperatur 10 Minuten luftgetrocknet und danach in RNase freiem Wasser (je nach Pelletgröße ca. 30 µl) resuspendiert. Die RNA-Lösung wird dann noch einmal für 10 Minuten bei 58 °C inkubiert.

**Bestimmung des RNA-Gehalts:** Bei einem Absorptionsspektrum von 240 bis 300 nm wird der RNA-Gehalt gegen Wasser (bidestilliert) im Photometer gemessen. Die Verdünnung beträgt 1:100 in bidestilliertem Wasser. Das Absorptionsmedium von RNA liegt bei 260 nm.

#### 2.2.1.3 Reverse Transkription der RNA in cDNA

Für die Umschreibung der RNA in cDNA wird pro Probe jeweils immer 1  $\mu\text{g}$  mit jeweils 7  $\mu\text{l}$  Wasser (bidestilliert) eingesetzt. Zu dieser verdünnten RNA-Probe fügt man 1  $\mu\text{l}$  DNase-Puffer (400 mM Tris-HCl, 100 mM  $\text{MgSO}_4$ , 10 mM  $\text{CaCl}_2$ , pH 8) und 1  $\mu\text{l}$  DNase (1 unit/ $\mu\text{l}$ ). Jetzt werden die Proben für 15 Minuten bei 37 °C im Thermocycler inkubiert. Um die DNase-Aktivität zu beenden, wird 1  $\mu\text{l}$  EDTA Stopp-Lösung (25 mM) hinzugegeben und für 10 Minuten bei 65 °C inkubiert. Anschließend werden die Proben kurz auf Eis gestellt, bevor der Random-Hexamerprimer 0,2  $\mu\text{g}$  hinzugegeben wird. Nach erneuter Inkubation für 5 Minuten bei 70 °C und der Abkühlung auf Eis, wird zu jeder Probe ein Mastermix, bestehend aus (je Probe) 4  $\mu\text{l}$  5xReaction Buffer (250 mM Tris-HCl, 259 mM KCl, 20 mM  $\text{MgCl}_2$ , 50 mM DTT, pH 8), 2  $\mu\text{l}$  dNTP-Mix (10 mM) und 1  $\mu\text{l}$  Wasser gegeben. Nach fünfminütiger Inkubation bei 25 °C wird zuletzt 1  $\mu\text{l}$  der Reversen Transkriptase zu jedem Ansatz pipettiert. Folgende Inkubationsschritte werden nun noch im Thermocycler durchgeführt: 10 Minuten bei 25 °C, 60 Minuten bei 42 °C und 10 Minuten bei 70 °C. Jetzt können die entstandenen cDNA-Proben bei -20 °C eingefroren werden.

#### 2.2.1.4 Realtime-RT-PCR

Für die Durchführung der Polymerasekettenreaktion in Echtzeit werden von jeder cDNA-Probe 2  $\mu\text{l}$  in einer Verdünnung von 1:10 in die Vertiefungen der PCR-Platte gegeben. Es werden also 10 ng cDNA pro Probe eingesetzt. Daraufgehend wird pro Vertiefung 18  $\mu\text{l}$  des zuvor angesetzten Mastermixes hinzupipettiert. Der Mastermix besteht aus 1  $\mu\text{l}$  TaqMan<sup>®</sup>-Primer-Probes, 7  $\mu\text{l}$  Wasser und 10  $\mu\text{l}$  TaqMan<sup>®</sup>-Universal PCR Master Mix. Anschließend wird die PCR-Platte mit einer selbstklebenden Folie abgedeckt und in das Gerät ABI Prism<sup>®</sup> 7000 SDS v1.1 gegeben. Die Platte wird zuerst zwei Minuten bei 50 °C inkubiert, bevor anschließend die Aktivierung der Polymerasen für 10 Minuten bei 95 °C erfolgt. Danach werden die Proben 15 Sekunden lang bei 95 °C denaturiert. Schließlich folgt die Annealing-Phase bei 60 °C und einer Minute, die 40 mal wiederholt wird.

#### 2.2.1.5 Auswertung

Bei der Auswertung der Realtime-RT-PCR-Ergebnisse kann man auf zwei unterschiedliche Methoden zurückgreifen: Die absolute und die relative Quantifizierung. In dieser Arbeit wird

die relative Quantifizierung verwendet, so dass auch nur letztere beschrieben wird. Die relative Quantifizierung beruht auf dem Bezug der Genexpression eines Zielgens auf ein weiteres nicht reguliertes sogenanntes „Housekeeping Gene“. In der RT-PCR wird nicht in DNA-Produktmengen bzw. -konzentrationen gerechnet, sondern als Maß für die Quantifizierung der Startmenge werden die sogenannten CT-Werte herangezogen. Der Parameter CT (threshold cycle) ist definiert als die Anzahl der Zyklen, bei der, entsprechend der Akkumulation von PCR-Produkten, die Veränderung der Fluoreszenzen eine festgelegte Schwelle überschreitet. Im günstigsten Fall verdoppelt sich mit jedem Zyklus die DNA-Produktmenge und analog dazu auch das Fluoreszenzsignal. Deswegen zeigt ein CT-Wert, der um eine Einheit geringer ist, eine doppelte Menge an eingesetzter cDNA bzw. mRNA an. Bei der hier verwendeten relativen Quantifizierung muss bei jeder Realtime-RT-PCR auch ein „Housekeeping-Gen“ verwendet werden, um die Expression des zu untersuchenden Gens mit diesem zu normalisieren. Dabei wird die Expression auf ein zweites, ubiquitär und homogen exprimiertes Gen bezogen. In den Untersuchungen wird das Enzym GAPDH, ein Enzym der Glykolyse, verwendet. Die Auswertung der durch die Software erhaltenen CT-Werte wird mit der sogenannten  $\Delta\Delta CT$ -Methode erreicht. Dabei wird im ersten Schritt für jede untersuchte Probe der CT-Wert des Referenzgens vom CT-Wert des zu untersuchenden Gens subtrahiert:

$$\Delta CT = CT_{\text{Probe}} - CT_{\text{GAPDH}} \quad (2.1)$$

Da die  $\Delta CT$ -Werte logarithmisch bestimmt werden, werden bei Stimulationsproben die  $\Delta CT$ -Werte auf die unstimulierten Kontrollproben normiert, um somit eine bessere Übersichtlichkeit zu erlangen. Nach der bei Gleichung (Gl.2.1) erfolgten Normierung wird vom  $\Delta CT$ -Wert der Proben der  $\Delta CT$ -Wert der Kontrolle abgezogen. So kommt man zum sog. „delta-delta-CT-Berechnungsmodell“ [27]:

$$\Delta\Delta CT = \Delta CT_{(\text{Stimulation})} - \Delta CT_{(\text{Kontrolle})} \quad (2.2)$$

Der relative Expressionsunterschied  $rel.Ex$  einer Probe zwischen der Stimulation und der Kontrolle, normalisiert zum Referenzgen und bezogen auf eine Standardprobe, ergibt sich aus der Formel:

$$rel.Ex = 2^{-\Delta\Delta CT} \quad (2.3)$$

Dieses Berechnungsschema setzt eine Verdopplung der DNA-Menge in jedem Zyklus voraus.

Durch wiederholte Versuche und dadurch erhaltene Mehrfachwerte wird der Mittelwert  $\bar{x}$  berechnet

$$\bar{x} = \frac{1}{N} \cdot \sum_{i=1}^N x_i \quad (2.4)$$

und die Standardabweichung  $s_x$  der Stichprobe zu

$$s_x = \sqrt{\frac{1}{N-1} \cdot \sum_{i=1}^N (x_i - \bar{x})^2} \quad (2.5)$$

Um den richtigen Wert der Standardabweichung auch bei der Normierung auf die Kontrolle zu erhalten, wird folgendes berechnet:

$$\text{Relativer Fehler} = 2^{Stabw} - 1 \quad (2.6)$$

Die Standardabweichung ist in den Diagrammen als Fehlerbalken dargestellt. Für die Varianzanalyse wurde der zweiseitige, heteroskedastische STUDENT t-Test angewendet, der mit dem Programm Microsoft Office Excel 2007 berechnet wurde. Die Signifikanzen wurden wie folgt festgelegt: \*\*\*  $p \leq 0,001$ ; \*\*  $p \leq 0,01$ ; \*  $p \leq 0,05$ .

## 2.2.2 Proliferationsassay

### 2.2.2.1 Überblick

Der Proliferationsassay bzw. -test ist ein Verfahren zur Messung der Dichte von Zellkulturen. Es wird dafür das CyQUANT<sup>®</sup> Cell Proliferation Assay Kit (C-7026) verwendet, welches aus drei Komponenten besteht:

- **Komponente A:** CyQUANT<sup>®</sup> GR Farbreagenz
- **Komponente B:** Zell-Lysis-Puffer
- **Komponente C:**  $\gamma$  DNA Standard

Die Basis des CyQUANT<sup>®</sup> Kits ist der grün fluoreszierende Farbstoff CyQUANT<sup>®</sup> GR, welcher eine starke Fluoreszenzerhöhung zeigt, wenn er an zelluläre Nukleinsäuren bindet. Eingefrorene Zellen werden durch Zugabe des Lysis-Puffers, der den Farbstoff enthält, gleichzeitig aufgetaut und lysiert. Daraufhin kann sofort die Fluoreszenz photometrisch gemessen werden.

#### 2.2.2.2 Zellkultivierung

Die Zellen werden zwei Tage in Schälchen mit Medium 10 % FCS vorinkubiert, so dass sich in jeder Schale die gleiche Zellanzahl befindet (100.000). Dann werden die Zellen mit PBS gewaschen und mit Medium 0,2 % FCS inkubiert. Einige Zellen wurden mit dem Inhibitor U0126 gelöst in DMSO angesetzt. Nachdem das Stimulans (200 ng/ml) hinzugegeben wird, werden die Zellen nochmal mit PBS gewaschen und eingefroren. Nach 24 Stunden kann dann der Proliferationstest durchgeführt werden.

### 2.2.2.3 Versuchsdurchführung

Nachdem die Zellen aufgetaut sind, wird jeweils zu jedem Schälchen 250  $\mu\text{l}$  verdünnter Lysis-Puffer und 5  $\mu\text{l}$  verdünnte RNase (0,8 U/ $\mu\text{l}$ ) gegeben. 1ml Lysis-Puffer wird mit 19 ml bidestilliertes Wasser verdünnt (1:20); 20  $\mu\text{l}$  der RNase werden mit 180  $\mu\text{l}$  bidestilliertem Wasser verdünnt (1:10). Nach einer Inkubationszeit von einer Stunde bei Raumtemperatur werden die Zellen mit einem Zellschaber abgekratzt und mit der Pipette zusammen mit dem Puffer aufgezogen, in sterile Caps überführt und anschließend vermischt. Jetzt werden wiederum 50  $\mu\text{l}$  von jeder Probe in neue sterile Caps pipettiert und dazu 200  $\mu\text{l}$  verdünnten Lysis-Puffer gegeben. Außerdem wird der Standard aus 2  $\mu\text{l}$   $\gamma$  DNA Standard und 198  $\mu\text{l}$  Wasser (bidestilliert) angesetzt. Davon werden jeweils 50  $\mu\text{l}$  in drei sterile Caps gefüllt. Ein Leerwert wird aus 50  $\mu\text{l}$  verdünntem Lysis-Puffer hergestellt. Nun wird zu jedem Cap 200  $\mu\text{l}$  verdünnter Lysis-Puffer pipettiert und in einem neuen Gefäß verdünnter Puffer mit dem Farbreagenz angesetzt: 10 ml verdünnter Lysis-Puffer wird mit 100  $\mu\text{l}$  des CyQUANT<sup>®</sup> Farbreagenz versetzt. Von dem verdünnten Farbreagenz können jetzt 250  $\mu\text{l}$  pro Probe, einschließlich des Leerwerts und der Standards, hinzugegeben werden. Nach fünfminütiger Inkubation bei Raumtemperatur kann mit der Messung begonnen werden.

### 2.2.2.4 Fluoreszenzmessung

Die Messung wird mit dem Gerät F-2000 Fluorescence Spectrophotometer durchgeführt. Vorher muss die Spannung auf 400 V, das Extinktionsmaximum auf 450 nm und das Emissionsmaximum auf 520 nm eingestellt werden. Zuerst werden der Leerwert und die Standards gemessen, bevor anschließend die Proben gemessen werden können.

### 2.2.2.5 Auswertung

Für die Auswertung werden von den Mehrfachwerten die Mittelwerte (Gl.2.4) gebildet. Die unstimulierte Kontrolle wird auf 100 % gesetzt, so dass die Messwerte der stimulierten Probe auf diesen Wert bezogen werden können. Die Standardabweichung ergibt sich nach Gleichung (2.5).

## 2.2.3 Western Blot

### 2.2.3.1 Überblick

Bei der Methode des Western Blots werden Proteine in einer vertikalen Elektrophoresekammer nach ihrer Größe aufgetrennt und anschließend auf einer PVDF-Membran sichtbar gemacht. Dieses Verfahren nennt man auch „Semi-dry-blotting“. Die Proteine werden durch hydrophobe

Wechselwirkungen an die Transfermembran gebunden. Dabei bleibt das charakteristische Muster der elektrophoretischen Auftrennung erhalten. Nach dem Transfer der Proteine müssen zuerst die freien Bindungsstellen der Membran blockiert werden. Dies geschieht mit Milchpulver, welches die unspezifische Bindung des Antikörpers an die geladene Membran verhindert. Um die Proteine auf der Membran sichtbar zu machen, werden zwei Antikörper verwendet.

Zuerst bindet der Primärantikörper an die Epitope des gesuchten Proteins, anschließend wird der Sekundärantikörper hinzugegeben, der gegen bestimmte Bereiche der Erstantikörper gerichtet ist und an diese bindet. Dieser Zweiantikörper ist mit dem Enzym HRP („Horse Radish Peroxidase“), also einer Meerrettich-Peroxidase gekoppelt. Dieses Enzym setzt das im Western Blot-Detection Kit befindliche Luminol um, welches in einen angeregten Zustand über geht. Wenn Luminol in seinen Grundzustand zurückfällt, wird Licht emittiert. Diese Chemilumineszenz wird dann auf einem Film sichtbar gemacht.

In diesem Fall soll die Western Blot-Methode dazu dienen bestimmte Signaltransduktionskaskaden zu untersuchen. Zum Beispiel wird eine Aktivierung von Signalkaskaden durch bestimmte Stimulationen nachgewiesen.

#### **2.2.3.2 Stimulation der Zellen**

Die Zellen werden auf kleine Flaschen ausgesät und wachsen zwei Tage an. Danach werden die Zellen dreimal mit Stimulationsmedium, serumfrei gespült und dann für zwei Stunden bei 37 °C äquilibriert. Es folgt die gewünschte Stimulation. Für die Zellgewinnung werden die Zellen kurz mit PBS bei Raumtemperatur gewaschen, das Medium gut abgezogen und mit 200 µl eiskaltem Lysispuffer überschichtet. Nachdem die Flaschen mit den Zellen für 10 Minuten auf Eis gelegt wurden, kann der Zellrasen mit dem Zellschaber abgekratzt werden. Jetzt kann der Proteingehalt bestimmt werden.

#### **2.2.3.3 Proteinbestimmung**

Die Proteinbestimmung wird mit dem Bio-Rad-Protein-Assay durchgeführt. Dies ist ein farbbindender Test basierend auf dem Farbwechsel des Farbstoffes in Bezug auf verschiedene Konzentrationen der Proteine. Es werden 5 µl von der Probe mit 795 µl Wasser (bidestilliert) vermischt. 10 µl Proteinstandard werden mit 5 µl Lysis-Puffer und 785 µl Wasser angesetzt und der Leerwert wird aus 5 µl Lysis-Puffer mit 795 µl Wasser hergestellt. Zu den Proben, zum Standard, sowie zum Leerwert werden jetzt 200 µl des Farbreagens hinzupipettiert und vermischt. Die Messung des Proteingehalts erfolgt am Photometer bei 595 nm, wobei erst der



Leerwert, dann der Standard und anschließend die Proben gemessen werden. Der Proteingehalt  $Pg$  wird wie folgt berechnet:

$$Pg = \frac{OD_{(Probe)}}{OD_{(Standard)}} \cdot 2 \quad (2.7)$$

Jetzt wird berechnet, wieviele der Proben  $Pr$  man mit dem Probenpuffer mischen muss, um 50  $\mu\text{g}$  Protein einzusetzen:

$$Pr = \frac{5}{Pg \cdot 5} \quad (2.8)$$

Die Probenpuffermenge  $Pu$  ergibt sich nun aus

$$Pu = 100\mu\text{l} - Pr \quad (2.9)$$

Abschließend werden die mit Puffer versetzten Proben fünf Minuten bei 95 °C gekocht und eingefroren.

#### 2.2.3.4 SDS-Gelelektrophorese

Der erste Schritt für die Vorbereitung der Gelelektrophorese ist das Aufbauen und Entfetten der Einzelteile der Gelapparatur. Anschließend wird das Trenngel gemäß Tabelle 2.8 vorbereitet und die Kammer damit zu 2/3 gefüllt. Um die Oberfläche nicht austrocknen zu lassen, wird Isopropanol über auf das Gel gespritzt. Nach 15 Minuten ist das Gel ausgehärtet und das Isopropanol kann mit einem Tuch entfernt werden. Jetzt wird das Sammelgel gemäß Tabelle 2.8 vorbereitet und bis zur Oberkante in die Kammer eingefüllt. Sofort werden die Kämme im Gel platziert. Nach 20minütiger Aushärtung werden die Kämme entfernt und jede Tasche mit Wasser gespült. Nun können die mit Gel bestückten Glasplatten in die Elektrophoresekammer umgesetzt und pro Tasche 20  $\mu\text{l}$  der Proben einpipettiert werden. Für die spätere Größenbestimmung muss in die erste Tasche 7  $\mu\text{l}$  eines Proteinstandards gegeben werden. Die Proben werden abschließend mit dem Elektrodenpuffer überschichtet, außerdem wird die gesamte Kammer damit geflutet. Bevor der Strom eingeleitet wird, gibt man einige Tropfen des Lauffrontanzeigers Bromphenolblau in die Kammer, der anzeigt, wann die Elektrophorese abgeschlossen ist. Nach ungefähr 30 Minuten kann der Strom (400 V, 340 mA, 25 W) abgeschaltet werden.

#### 2.2.3.5 „Semi-Dry-Blotting“

Zunächst wird die PVDF-Transfermembran und das Whatman-Papier zurechtgeschnitten und im Transferpuffer eingeweicht. Die Membran muss vorher kurz mit Methanol überschichtet werden. Auch die Platten des Blotters werden mit Transferpuffer benetzt, bevor die erste Lage Whatman-Papier und die Transfermembran darauf gelegt werden. Nach diesen Vorbereitungen kann das Gel vorsichtig von den Glasplatten getrennt und auf die Membran gelegt werden.

Tabelle 2.8: Trenn- und Sammelgel für den Western Blot

	<b>Trenngel 10 %</b>	<b>Sammelgel 4,5 %</b>
Gelpuffer I	2,6 ml	-
Gelpuffer II	-	2,6 ml
Acrylamid	3,33 ml	1,67 ml
H <sub>2</sub> O	4,03 ml	5,79 ml
APS 10 % (0,1 g APS, 0,9 ml H <sub>2</sub> O)	60 $\mu$ l	60 $\mu$ l
TEMED	30 $\mu$ l	30 $\mu$ l

Abschließend wird nochmals eine Lage des Papiers auf das Gel gelegt, alle Blasen beseitigt und die Apparatur geschlossen. Für eine Dauer von 45 Minuten wird eine maximale Spannung von 25 V und ein Strom von 179 mA eingestellt.

### 2.2.3.6 Antikörperzugabe

Nach dem Blotting wird die Membran 45 Minuten zur Blockierung unspezifischer Bindungen in Milchpulver (5 g ad 100 ml Aqua dest.) geschüttelt. Anschließend wird der Blot dreimal fünf Minuten mit TBS-T gespült, bevor der Primärantikörper aufgetragen werden kann. 1 ml verdünnter Antikörper (siehe Tabellen 2.4 und 2.5) werden auf den Blot pipettiert und beides zusammen in Folie eingeschweißt. Bei 4 °C inkubiert die Membran über Nacht.

Am nächsten Tag wird die Membran aus der Folie genommen und nach dreimaligem Spühlen mit TBS-T mit dem verdünnten Sekundärantikörper (siehe Tabellen 2.4 und 2.5) versetzt. Nach einstündiger Inkubation und dreimaligem Waschen mit TBS-T kann mit der Detektion begonnen werden.

### 2.2.3.7 Detektion der Banden

Hierfür wird das gebrauchsfertige Western Blotting Detection Kit benutzt, das aus Lösung A und Lösung B besteht, die im Verhältnis 1:1 (je 2,5 ml) zusammen gleichmäßig auf den Blot gegeben werden. Nach fünf Minuten wird das Gemisch entfernt und der Blot in Klarsichtfolie eingeschlagen, um ein Austrocknen zu verhindern. In einer Filmkassette fixiert, kann der Blot nun in der Dunkelkammer von einem Film für ca. 20 Sekunden abgedeckt werden. Dieser wird danach sofort kurz in das Entwicklerbad getaucht, dann in Wasser und zum Fixieren zusätzlich fünf Minuten in das Fixierbad.

#### 2.2.3.8 Reblot

Um die Auftragung zu kontrollieren kann ein Reblot durchgeführt werden. Dabei wird der Blot kurz mit Methanol gespült, dann dreimal fünf Minuten mit 0,1 mol/l Glycin, pH 2,5 und dreimal fünf Minuten mit 0,1 mol/l Tris, pH 7,5 gespült. Danach wird die Membran eine Stunde mit Milchpulver blockiert und der nicht-phosphorylierte Erstantikörper aufgetragen, eingeschweißt und über Nacht bei 4 °C gelagert. Am nächsten Tag wird der Blot dreimal fünf Minuten mit TBS-T gespült und abschließend der Zweitantikörper hinzugegeben. Der weitere Ablauf gleicht dem Prozedere des normalen Western Blots. Anhand des Reblots kann die Menge der phosphorylierten Proteine auf die unphosphorylierten Proteine relativiert werden, so dass genaue Werte der zu detektierenden Antikörper analysiert werden können.

#### 2.2.3.9 Auswertung

Die Auswertung des Blots erfolgt über Einscannen und anschließender densitometrischen Analyse mit der PC-Software „PCBas“. Das Programm misst die Schwärzung der Banden des Blots und des Reblots. Um den korrigierten Wert zu erhalten muss der Wert des Reblots durch den Blotwert dividiert werden. Die Kontrolle wird auf 1 normiert, so dass eine einfachere Bewertung in Bezug auf Kontrolle und Stimulationen möglich ist.

### 2.2.4 Immuncytochemie

#### 2.2.4.1 Überblick

In der Immuncytochemie werden Proteine direkt an den Zellen sichtbar gemacht. Das Verfahren basiert auf der Bindung des Primärantikörper an die zu untersuchenden Proteine. Der Sekundärantikörper, der mit einem fluoreszierenden Farbstoff verbunden ist, richtet sich gegen Epitope des Erstantikörpers und bindet daran. Die Emission des Lichts zeigt die Anwesenheit des gesuchten Antigens in der Zelle.

#### 2.2.4.2 Vorgehen

Die auf Deckgläschen kultivierten Glial precursor cells (GPC) werden zuerst dreimal fünf Minuten mit PBS gewaschen, bevor sie danach 10 Minuten in eiskaltem Aceton/Methanol-Gemisch (1:1) fixiert werden. Nach anschließendem dreimaligen Spülen für fünf Minuten mit PBS und Blockieren mit 0,1 % BSA/0,2 % Glycin-Gemisch für eine Stunde, wird der in PBS verdünnte Primärantikörper (siehe Tabellen 2.2 und 2.3) auf die Deckgläschen pipettiert. Über Nacht erfolgt eine Inkubation in der feuchten Kammer bei 4 °C.

Am nächsten Tag werden die Deckgläschen dreimal fünf Minuten mit PBS gewaschen, mit dem Sekundärantikörper versehen und eine Stunde lang bei 37 °C in der feuchten Kammer inkubiert. Nach erneutem Spülvorgang (3x5 Min.) mit PBS werden die Zellen 30 Minuten mit DAPI (100 µl gebrauchsfertige Lösung) bei Raumtemperatur in der feuchten Kammer inkubiert. DAPI färbt die Kerne der Zellen blau. Zum Abschluss werden die Deckgläschen wiederholt mit PBS gewaschen und mit Immunomount eingedeckelt. Nach dem Trocknen bei 4 °C werden die Präparate mit dem Axiophot Mikroskop mikroskopiert und fotografiert.

## 2.2.5 Migrationsversuch („Scratchtest“)

### 2.2.5.1 Überblick

Beim Migrationsversuch wird mit Hilfe eines Kratzers („Scratch“) in einer konfluent bewachsenen Schale das Migrationsverhalten der Zellen beobachtet. Durch verschiedene Stimulationsmedien wird verglichen, ob es zu Unterschieden in der Migration kommt.

### 2.2.5.2 Vorgehen

Die Glial precursor cells (GPC) werden in Schälchen solange kultiviert bis unter dem Mikroskop ein dichter Zellrasen zu erkennen ist. Nun kann unter der sterilen Werkbank mit dem Versuch begonnen werden. Mit einer sterilen Pipettenspitze wird der Scratch in den Zellrasen geritzt, so dass dieser Bereich frei von Zellen ist und mikroskopisch ein deutlicher Pfad zu sehen ist. Nach dem Mediumwechsel wird das Zellschälchen unter dem Mikroskop Axiophot, Zeiss 10 Stunden lang beobachtet, wobei alle 10 Minuten ein Foto vom jeweiligen Zustand gemacht werden muss. Das Mikroskop besitzt eine CO<sub>2</sub>-Zuleitung (7 %) und einen beheizbaren Objektisch, dessen Temperatur bei 35 °C gehalten wird. Für die Stimulation der Zellen wird das Stimulans VEGF-D in einer Konzentration von 100 ng/ml eingesetzt und dann auf eine Scratch-Stelle im Schälchen gegeben.

### 2.2.5.3 Auswertung

Die in bestimmten Zeitabständen gemachten Fotos werden nun mit dem PC-Programm „PC-Bas“ ausgewerten. Dabei wird die zuvor freie (gescratchte) Fläche mit der nach 10 Stunden verbliebenen Fläche verglichen. Die Stimulationsproben werden mit der Kontrolle verglichen und auf die ursprüngliche Scratch-Fläche normiert.

$$A_{besiedelt} = A_{0h} - A_{10h} \quad (2.10)$$

$$A_{norm} = \frac{A_{besiedelt}}{A_{0h}} \cdot 100 \quad (2.11)$$

---

# Kapitel 3

## Ergebnisse

### 3.1 Genexpression

#### 3.1.1 Genexpression der VEGF-Derivate in murinen Zelllinien

Auf der Suche nach Zellen, die die VEGF-Derivate VEGF-A, VEGF-C und VEGF-D, sowie die Rezeptoren VEGFR-1, VEGFR-2 und VEGFR-3 exprimieren, wurden verschiedene Zellen aus dem Gehirn untersucht: Neurone, Neuroblastome (Neuro 2a), Astrozyten, Oligodendrozyten, Schwannomazellen und Microglia untersucht. Zusätzlich wurden mit Hilfe der Realtime-RT-PCR-Methode die immortalisierten Glia-Vorläuferzellen Glial precursor cells (GPC), die immortalisierten Microglia-Zelllinien und die bEND-Linie (Brain endothelial cells) untersucht. Es wurden pro Probe jeweils 10 ng cDNA eingesetzt. Die Realtime-PCR wurde dreimal pro Probe durchgeführt, so dass am Ende Dreifachwerte vorlagen. In den Abbildungen sind die berechneten  $\Delta CT$ -Werte und die daraus resultierenden relativen Expressionen dargestellt.

Die Abbildung 3.1 zeigt, dass die VEGF-A-Expression in allen Zelllinien und Kulturen deutlich nachgewiesen werden konnte. Auffällig ist der Unterschied in der Expression zwischen den Zelllinien und den Primärkulturen. Die Glial precursor cells (GPC), sowie die immortalisierten Microglia-Zellen zeigen jeweils eine 10fach höhere Expression des VEGF-A als die Astrozyten bzw. Microglia. Die höchsten Expressionen zeigen die Glial precursor cells (GPC) und die Oligodendrozyten.

Die Expression des VEGF-C zeigt eine weniger deutliche Ausprägung (Abbildung 3.2). In den Oligodendrozyten und der Microglia konnte kein VEGF-C nachgewiesen werden. Die kräftigste Expression zeigen die GPC, wobei wieder eine 10fach höhere Expression als bei den primären Astrozyten detektiert wurde.

Das VEGF-D kommt dagegen wieder ubiquitär vor, sowohl in den Zelllinien als auch in den Kulturen (Abbildung 3.2). Auch hier ist die deutlichste Expression in den GPC, den Schwannomazellen und der bEND-Zelllinie zu beschreiben. Die immortalisierte Microglia hat mit einem fast 1000fach niedrigeren Wert die geringste Expression des VEGF-D.

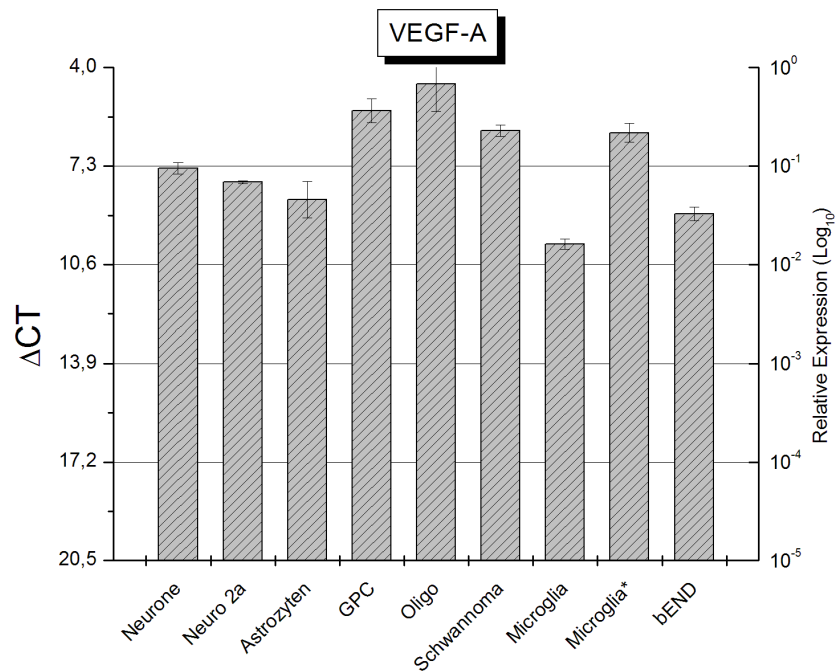


Abbildung 3.1: VEGF-A-Expression in murinen Zelllinien

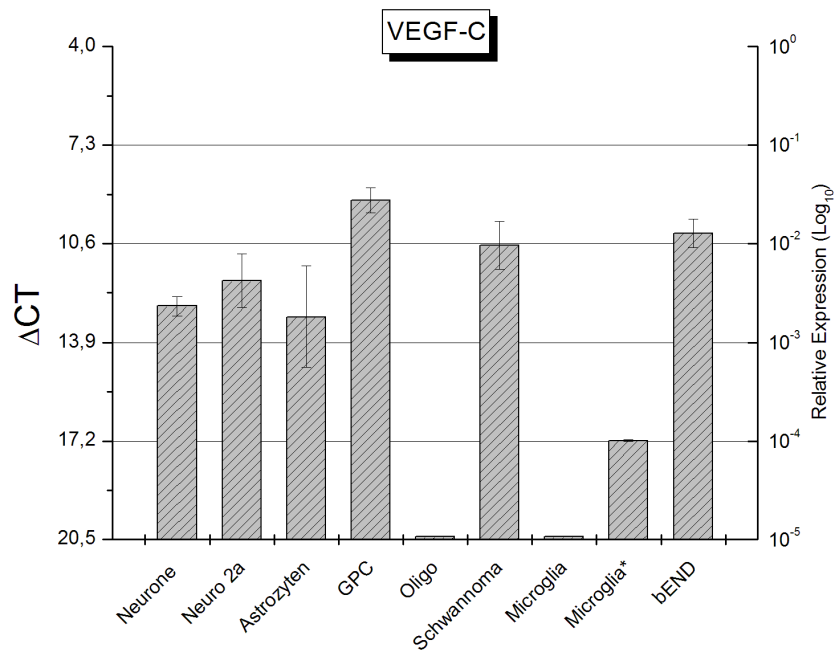


Abbildung 3.2: VEGF-C-Expression in murinen Zelllinien

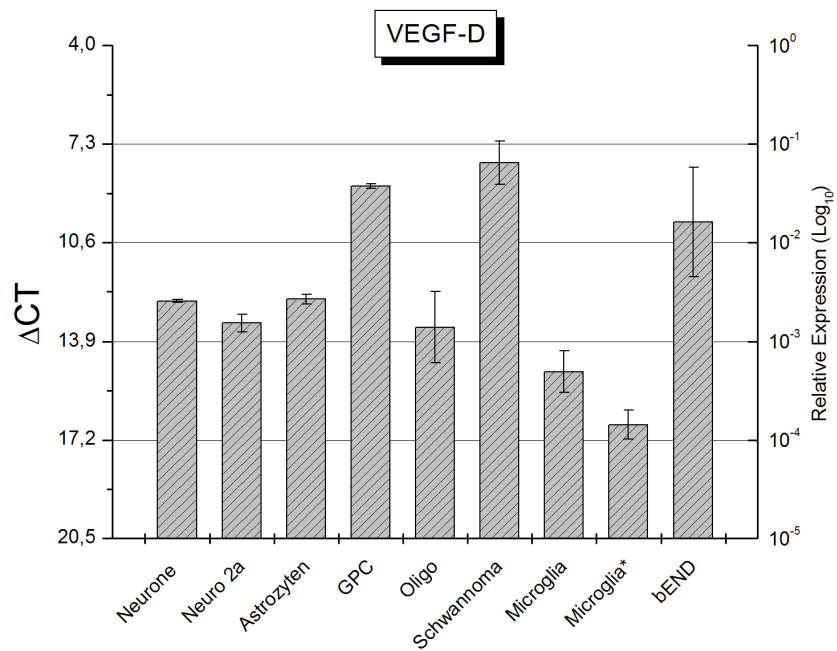


Abbildung 3.3: VEGF-D-Expression in murinen Zelllinien

### 3.1.2 Genexpression der VEGF-Rezeptoren in murinen Zelllinien

Nach der Untersuchung der VEGF-Derivate wurden die Zelllinien auf ihren Gehalt an den VEGF-Rezeptoren untersucht.

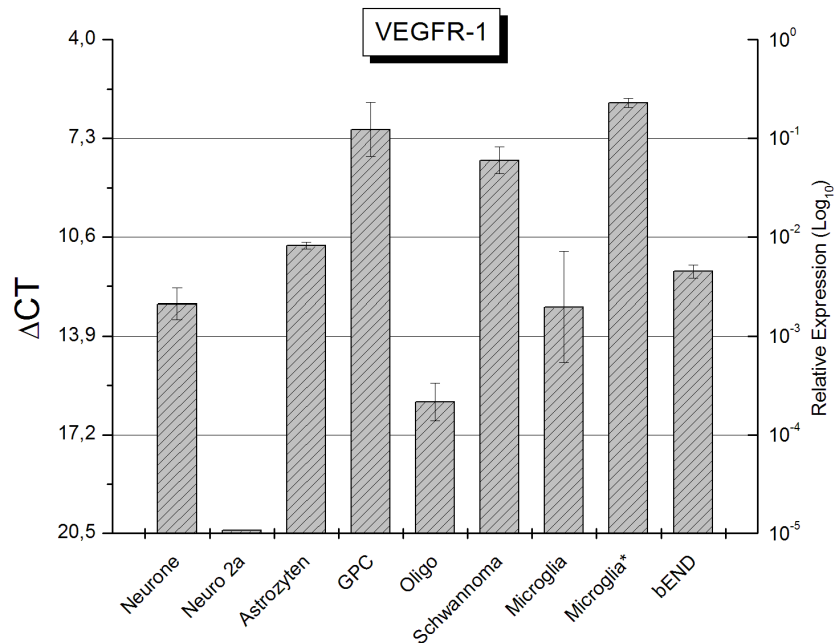


Abbildung 3.4: VEGFR-1-Expression in murinen Zelllinien

Wie in Abbildung 3.4 zu erkennen ist, zeigen alle Zelllinien eine Expression des VEGFR-1 bis auf die Neuroblastomlinie Neuro2a. Eine sehr hohe Expression kann man den GPC, den Schwannomazellen und der immortalisierten Microglia zuschreiben.

Auch der VEGFR-2 konnte in den Neuro2a-Linie nicht nachgewiesen werden. Fast alle anderen Zelllinien zeigten eine 10- bis 100fach verringerte Expression des Rezeptors VEGFR-2 als bei VEGFR-1. Ausgenommen sind hier die Neurone und die bEND-Zelllinie, die mehr VEGFR-2 als VEGFR-1 exprimieren (Abbildung 3.5). (Gleiche Amplifikationseigenschaften der TaqMan<sup>®</sup>-Primer sind vorausgesetzt.)

Abbildung 3.6 zeigt bei jeder Zelllinie eine VEGFR-3-Expression. Die höchste Messung erfolgte bei den GPC, die eine 1000fach höhere Expression zeigen als die Expression der primären Astrozyten. Die bEND-Zellen exprimieren den Rezeptor VEGFR-3 stärker als VEGFR-1.

Zusammenfassend ist festzustellen, dass die Glial precursor cells (GPC) in Hinblick auf die vorliegende Aufgabenstellung die höchsten Expressionen des VEGF-C und VEGF-D, sowie des Rezeptors VEGFR-3 aufweisen. Somit sind die Glial precursor cells eine geeignete Zelllinie



mit der man weitere Untersuchungen bezüglich des Rezeptors VEGFR-3 und den Liganden VEGF-C und -D machen könnte. Alle folgenden funktionellen Studien wurden daraufhin mit den GPC durchgeführt.

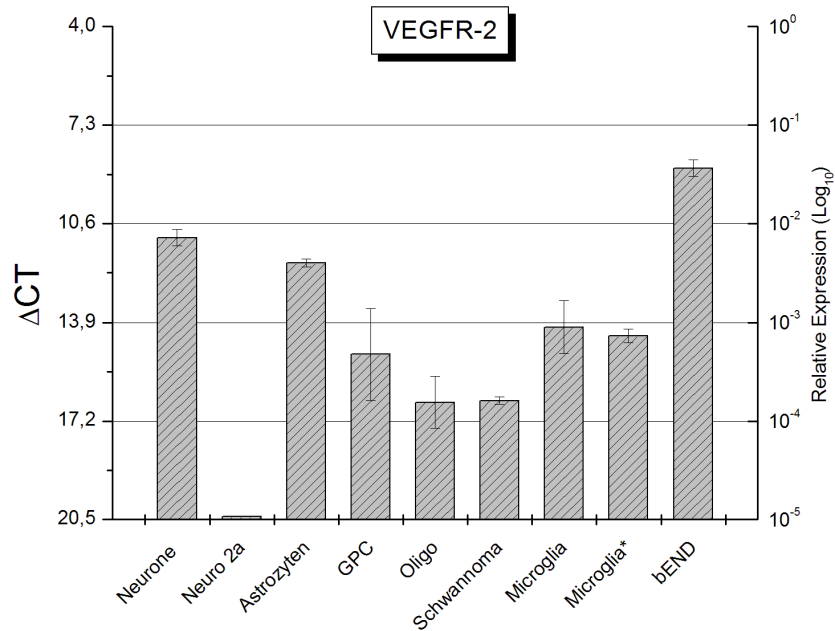


Abbildung 3.5: VEGFR-2-Expression in murinen Zelllinien

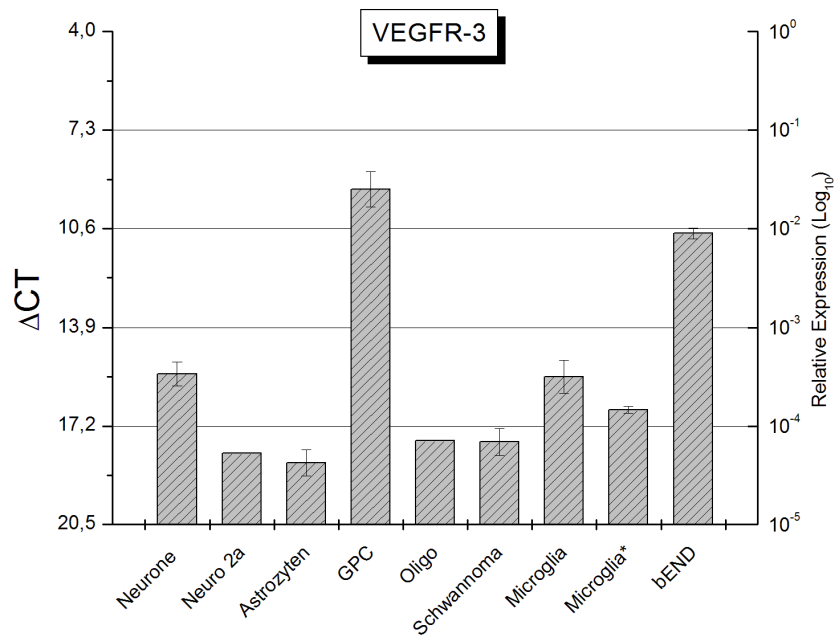


Abbildung 3.6: VEGFR-3-Expression in murinen Zelllinien

### **3.1.3 Genexpression der VEGF-Derivate in murinen Geweben**

Desweiteren wurden die VEGF-Expressionen an verschiedenen Gehirnproben und der Milz untersucht. Als Gehirnproben lag Material des 18. Embryonaltages und des sechsten postnatalen Tages vor, sowie Gewebe des adulten (3 Monate alten) Tieres.

Anhand der Abbildungen 3.7 und 3.8 zeigt sich, dass alle Sorten des VEGF in allen Proben nachgewiesen werden konnten. VEGF-A wird in allen Geweben am deutlichsten exprimiert. Es liegt hier eine 10fach höhere Expression als zum Beispiel bei VEGF-C vor. Wenn man die Ergebnisse der Untersuchung von VEGF-A und VEGF-C mit VEGF-D vergleicht, fällt auf, dass die Expression des VEGF-D im P6-Gehirn am größten ist, wohingegen die Expression des VEGF-A und VEGF-C im adulten Gehirn die höchsten Messergebnisse zeigte.

### **3.1.4 Genexpression der VEGF-Rezeptoren in murinen Geweben**

Es wurde auch der Gehalt an VEGF-Rezeptoren in murinen Gehirnproben und der Milz untersucht (Abbildungen 3.9 und 3.10). Dabei kam heraus, dass auch alle VEGF-Rezeptoren in diesen Geweben exprimiert werden. Die Untersuchungen zeigen, dass die Expression des VEGFR-1 mit dem Alter des Gehirns eine immer deutlichere Ausprägung hat. Wohingegen die Rezeptoren VEGFR-2 und VEGFR-3 die höchste Expression am postnatalen Tag 6 erlangen und die niedrigste im adulten Stadium.

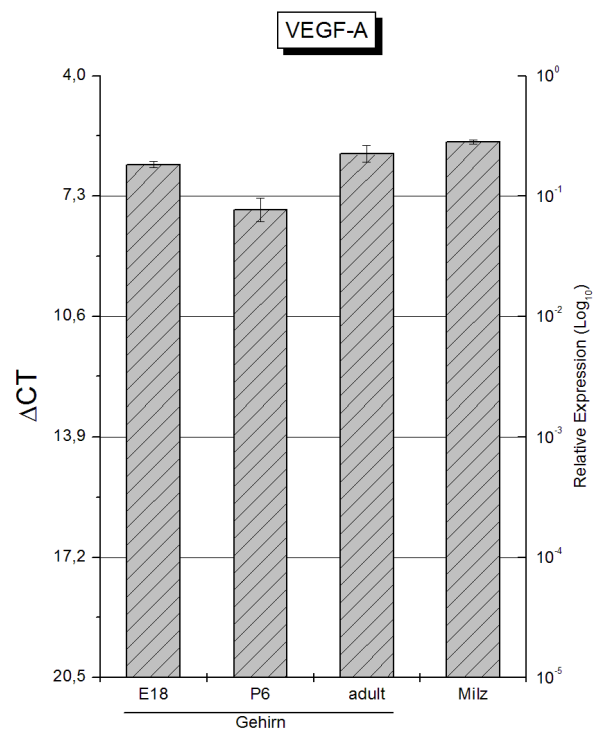


Abbildung 3.7: VEGF-A-Expression in murinen Geweben

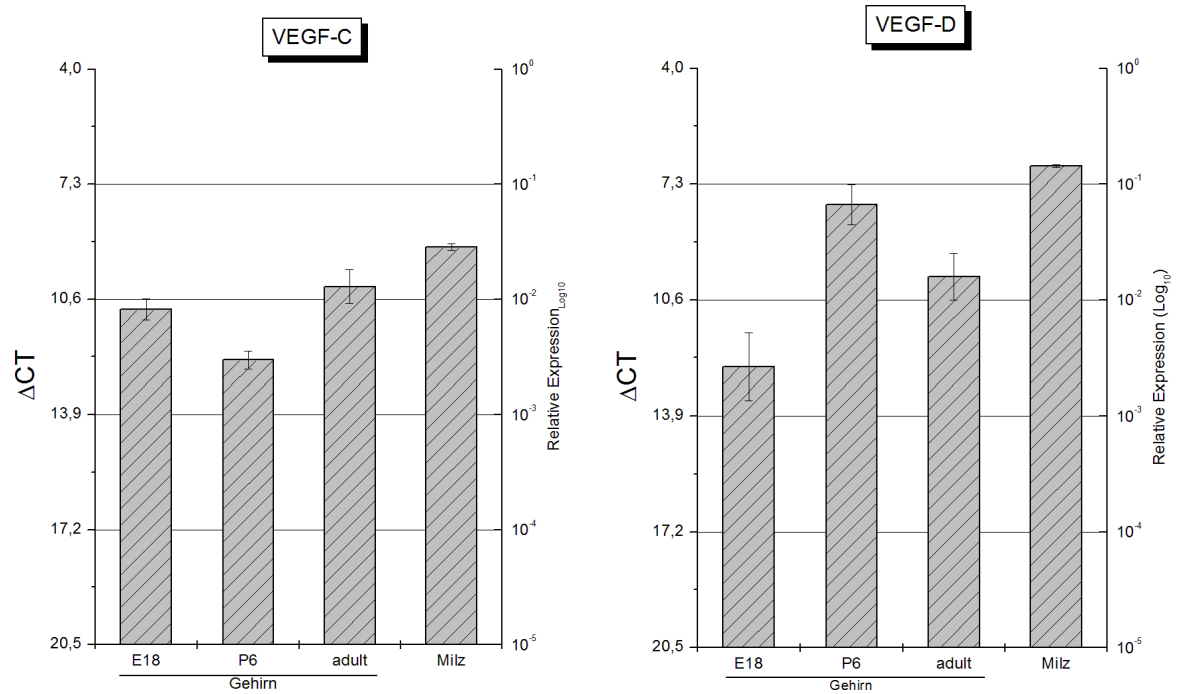


Abbildung 3.8: VEGF-C und -D-Expressionen in murinen Geweben

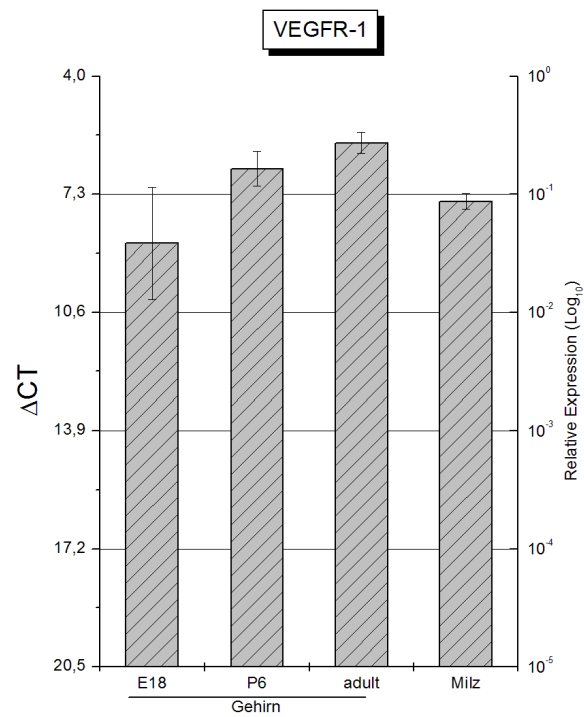


Abbildung 3.9: VEGFR-1-Expression in murinen Geweben

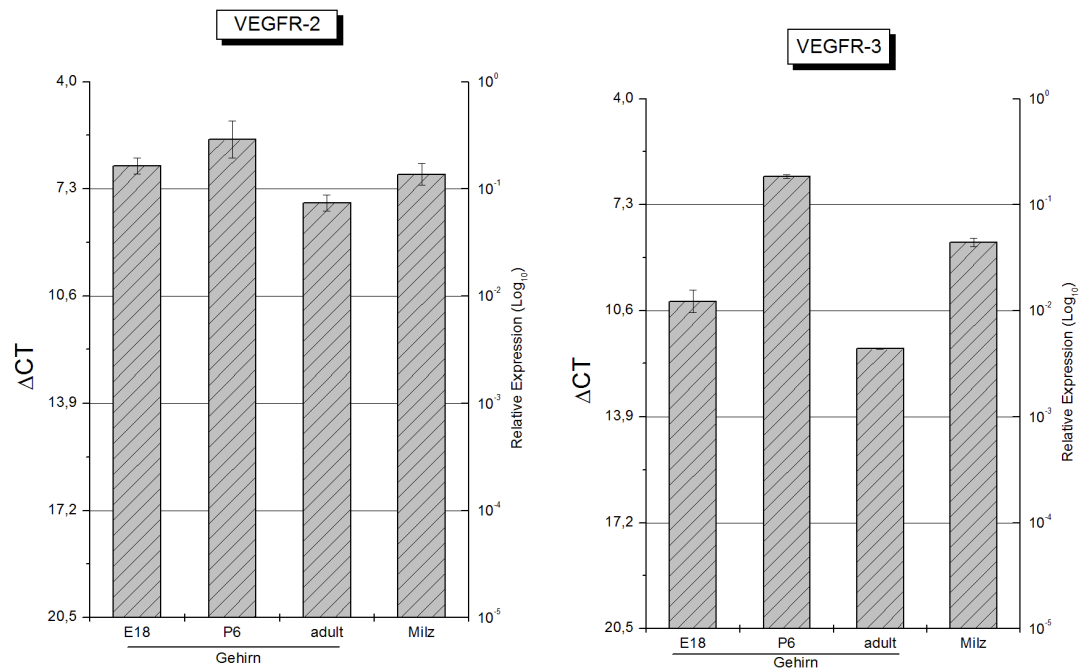


Abbildung 3.10: VEGFR-2 und -3-Expressionen in murinen Geweben

### 3.1.5 Glial precursor cells (GPC): Effekte von Zytokinen und VEGF-Derivaten auf die Genexpression

Um zu untersuchen, ob Zytokine und Wachstumsfaktoren auf die Genexpression der VEGF-Derivate und VEGF-Rezeptoren wirken, wurden Glial precursor cells (GPC) für 24 Stunden in serumfreien Medium (0,1 % BSA) mit verschiedenen Zytokinen (10 ng/ml) und Faktoren (100 ng/ml) stimuliert. Neben der Kontrolle wurde eine Dreifachbestimmung von stimulierten GPC mit den Zytokinen  $\text{TNF}\alpha$ ,  $\text{IFN}\gamma$ ,  $\text{TNF}\alpha$  und  $\text{IFN}\gamma$  in Kombination, IL-1 und IL-4 durchgeführt, sowohl mit Glutaminsäure (10 mM) und den VEGF-Derivaten VEGF-A, VEGF-C und VEGF-C<sub>152S</sub>, das selektiv VEGFR-3 stimuliert. Die Ergebnisse wurden anschließend auf die unstimulierte Kontrolle normiert.

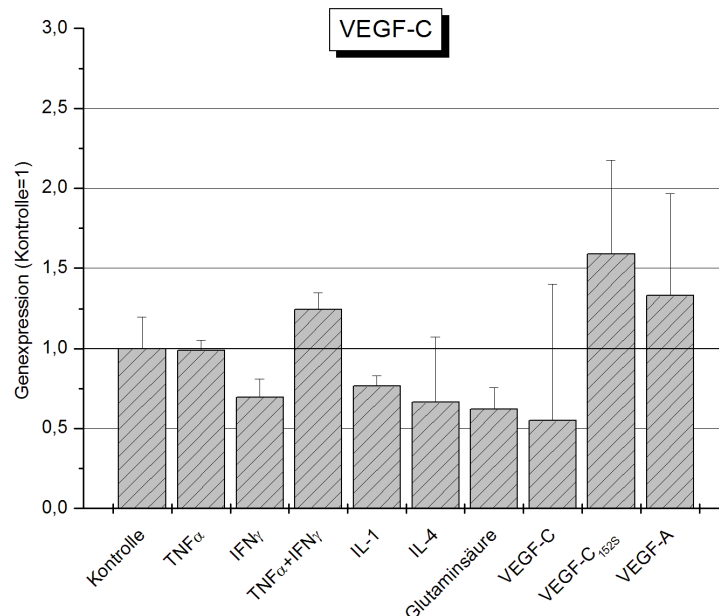


Abbildung 3.11: Regulation der Genexpression von VEGF-C nach Stimulation der Glial precursor cells (GPC); Zytokine und Wachstumsfaktoren 10 ng/ml bzw. 100 ng/ml, serumfrei, 24 h

Die Untersuchungen ergaben, dass, wie in Abbildung 3.11 zu erkennen ist, der Wachstumsfaktor VEGF-C von kaum einem Zytokin hochreguliert wird. Einzig und allein die Kombination von  $\text{TNF}\alpha$  und  $\text{IFN}\gamma$  bewirken einen leichten Anstieg der VEGF-C-Expression um das 0,25fache ausgehend von der Kontrolle.  $\text{IFN}\gamma$ , IL-1 und IL-4 hemmen dagegen die Expression des VEGF-C, ebenso wie Glutaminsäure und VEGF-C selber. Die Stimulation mit VEGF-C<sub>152S</sub> und VEGF-A ergab eine Steigerung der Genexpression auf das 1,6 bzw. 1,3fache.

Die Genexpression des Wachstumsfaktors VEGF-D wird ebenfalls wenig von den Zytokinen

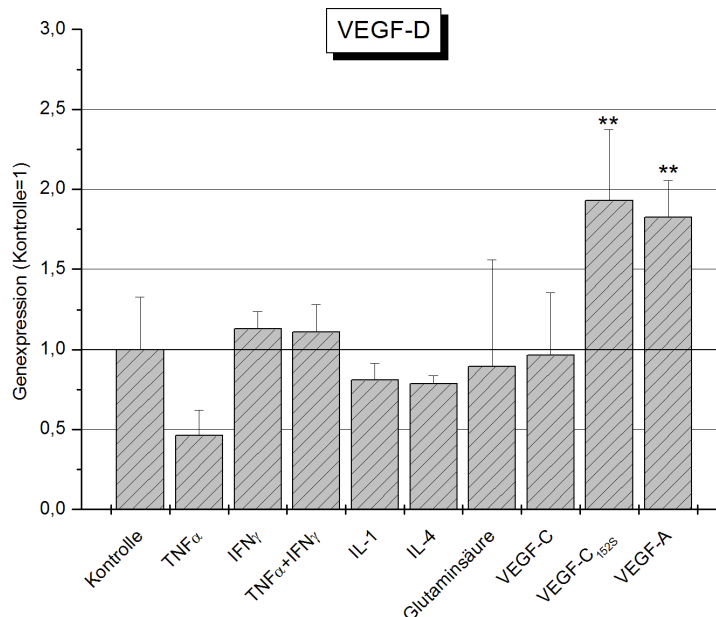


Abbildung 3.12: Regulation der Genexpression von VEGF-D nach Stimulation der Glial precursor cells (GPC); Zytokine und Wachstumsfaktoren 10 ng/ml bzw. 100 ng/ml, serumfrei, 24 h

beeinflusst. IFN $\gamma$  und die Kombination von TNF $\alpha$  und IFN $\gamma$  ergaben eine geringe Steigerung der Expression auf das 0,2fache. Wie aus der Abbildung 3.12 hervorgeht, bewirken die Stimulation der GPC mit VEGF-C<sub>152S</sub> und VEGF-A eine signifikante Hochregulation auf das 1,9 bzw. 1,8fache ( $p \leq 0,01$ ), ähnlich der Regulation des VEGF-C.

Der Rezeptor VEGFR-2 wird durch VEGF-A auf das 9fache hochreguliert ( $p \leq 0,001$ ), das Zytokin IFN $\gamma$  verursacht eine Steigerung der Genexpression auf das 4fache ( $p \leq 0,01$ ) ausgehend von der unstimulierten Kontrolle. Alle anderen untersuchten Zytokine und Faktoren, sowie die Glutaminsäure haben keinen bzw. nur sehr wenig Einfluss auf die Regulation des VEGFR-2 (Abbildung 3.13).

Auch der Rezeptor VEGFR-3 wurde durch eine Stimulation mit VEGF-A signifikant auf das 4,5fache hochreguliert ( $p \leq 0,001$ ), außerdem erfolgte eine Erhöhung der Expression um das 1,5fache durch IFN $\gamma$  ( $p \leq 0,01$ ). Im Vergleich mit dem Rezeptor VEGFR-2 konnten allerdings auch IL-1 und VEGF-C<sub>152S</sub> einen Effekt auf das 2,1 bzw. 1,2fache erzeugen, wie aus der Abbildung 3.14 ersichtlich wird.

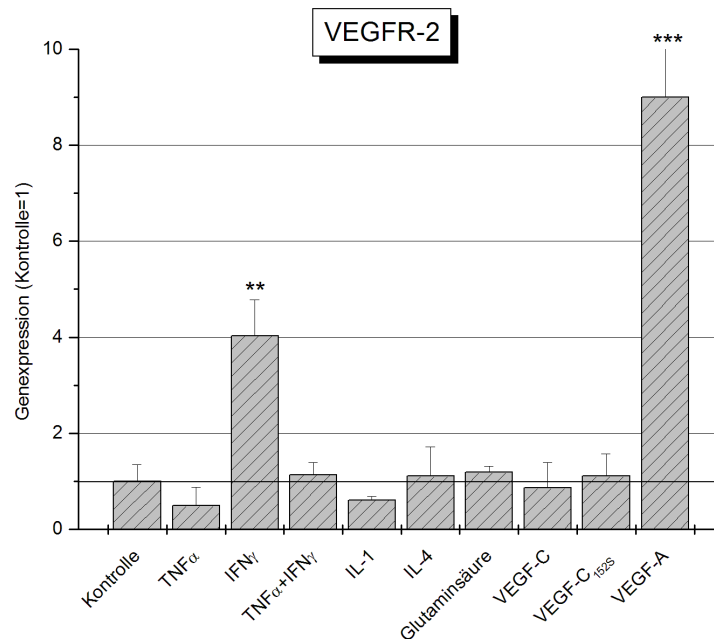


Abbildung 3.13: Regulation der Genexpression von VEGFR-2 nach Stimulation der Glial precursor cells (GPC); Zytokine und Wachstumsfaktoren 10 ng/ml bzw. 100 ng/ml, serumfrei, 24 h

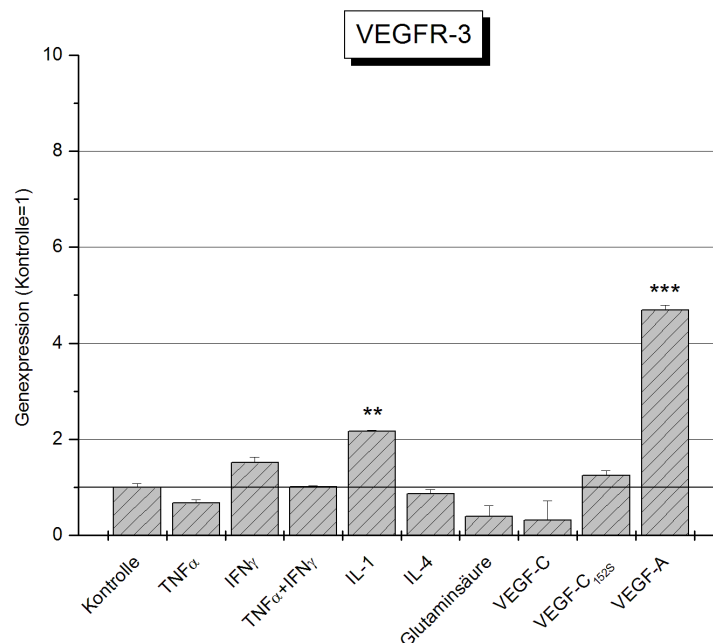


Abbildung 3.14: Regulation der Genexpression von VEGFR-3 nach Stimulation der Glial precursor cells (GPC); Zytokine und Wachstumsfaktoren 10 ng/ml bzw. 100 ng/ml, serumfrei, 24 h

### 3.2 VEGFR-1, VEGFR-2 und VEGFR-3 in der Immuncytochemie

Die Glial precursor cells (GPC) und die Rezeptoren VEGFR-1, VEGFR-2 und VEGFR-3 wurden zusätzlich noch mit der Immuncytochemiemethode untersucht. Dabei werden die Rezeptoren durch fluoreszierende Antikörper sichtbar gemacht und können mit dem Mikroskop mikroskopiert und fotografiert werden.

Die Abbildung 3.15 zeigt eine Auswahl der Fotos in 20facher und 40facher Vergrößerung, wobei die Rezeptoren VEGFR-2 und -3 mit einem rotem Farbstoff markiert wurden, VEGFR-1 dagegen mit einem grünen und die Kerne der Glial precursor cells mit einem blauen Farbstoff. Man erkennt deutlich die Rotfärbung der Zellkörper, welche einen Gehalt an VEGFR-2 und -3 beweist. Ebenfalls kann man den Rezeptor VEGFR-1 eindeutig durch die Grünfärbung nachweisen. Zu sehen ist außerdem, dass VEGFR-1 und VEGFR-3 mit höherer Intensität sichtbar gemacht werden konnten als VEGFR-2. Dieses Ergebnis zeigt, dass nicht nur mRNA für VEGFR-1, -2 und -3, sondern auch die Proteine an den Glial precursor cells (GPC) exprimiert werden.



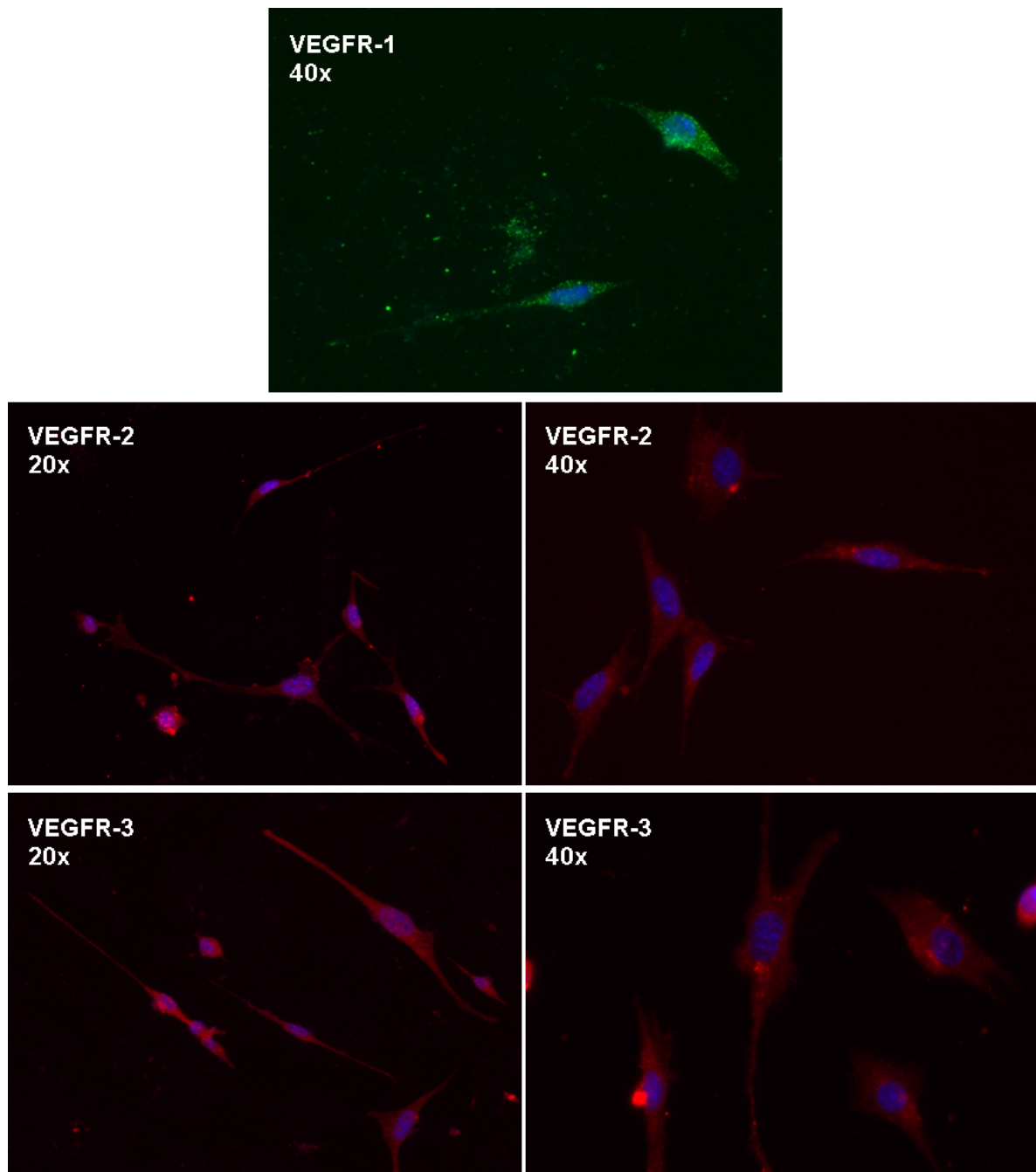


Abbildung 3.15: Immunfluoreszenzfärbung von VEGFR-1 (grün), VEGFR-2 bzw. VEGFR-3 (rot) und Kernfärbung (blau) in 20facher und 40facher Vergrößerung

### 3.3 Einfluss von VEGF-Derivaten auf die Signaltransduktion

Um herauszufinden, ob die VEGF-Derivate auch funktionell aktiv sind, wurden die Signaltransduktionswege mithilfe der Western Blot-Methode untersucht.

#### 3.3.1 Untersuchung der Kinasen Akt und Erk

Zuerst wurde eine allgemeine Untersuchung der Signalkaskaden Akt und Erk mit zuvor stimulierten Glial precursor cells vorgenommen. Die Stimulationen erfolgten mit VEGF-C, VEGF-C<sub>152S</sub> und VEGF-D bei unterschiedlicher Dauer. Nach ersten Experimenten mit den beiden Antikörpern stellte sich heraus, dass die Stimulation keinen Effekt auf die Signalkaskade Akt hat. Somit lag der Schwerpunkt der Untersuchung bei der Phosphorylierung von Erk.

#### 3.3.2 Zeitabhängigkeit der Phosphorylierung der Kinase Erk nach Stimulierung mit VEGF-Derivaten

Wie Abbildung 3.16 zeigt, wurde zuerst eine Stimulationsreihe bestehend aus 5minütiger, 10minütiger und 30minütiger Stimulation mit VEGF-C und VEGF-C<sub>152S</sub> hergestellt und mit der Western Blot-Methode ausgewertet. Die Ergebnisse wurden anschließend auf die unstimulierte Kontrolle normiert. In der Grafik sind zusätzlich die Banden-Bilder des phosphorylierten und dephosphorylierten Erk dargestellt. Die Phosphorylierung von Erk erreichte nach einer 30minütigen Stimulation mit VEGF-C ihren Höhepunkt, bei Stimulation durch VEGF-C<sub>152S</sub> schon nach 10 Minuten und nach 30 Minuten kam es sogar schon wieder zu einer Abnahme der Erk-Konzentration.

#### 3.3.3 Inhibitionsversuche

Um den Effekt genauer zu charakterisieren, wurden bei einigen Stimulationen das Lösungsmittel DMSO oder der Inhibitor des MAP-Kinasewegs U0126 (in DMSO) eingesetzt. Wie in der Abbildung 3.17 zu erkennen ist, wurde beim nächsten Versuch ausschließlich mit VEGF-C für 5 bzw. 15 Minuten stimuliert, einmal mit DMSO und einmal mit U0126. Die Phosphorylierung des Erk lässt sich wie erwartet durch U0126 hemmen. Die höchste Konzentration von Erk ließ sich nach 15minütiger Stimulation zusammen mit DMSO nachweisen, wobei eine Erhöhung auf das 1,7fache ausgehend von der unstimulierten Kontrolle daraus resultierte.

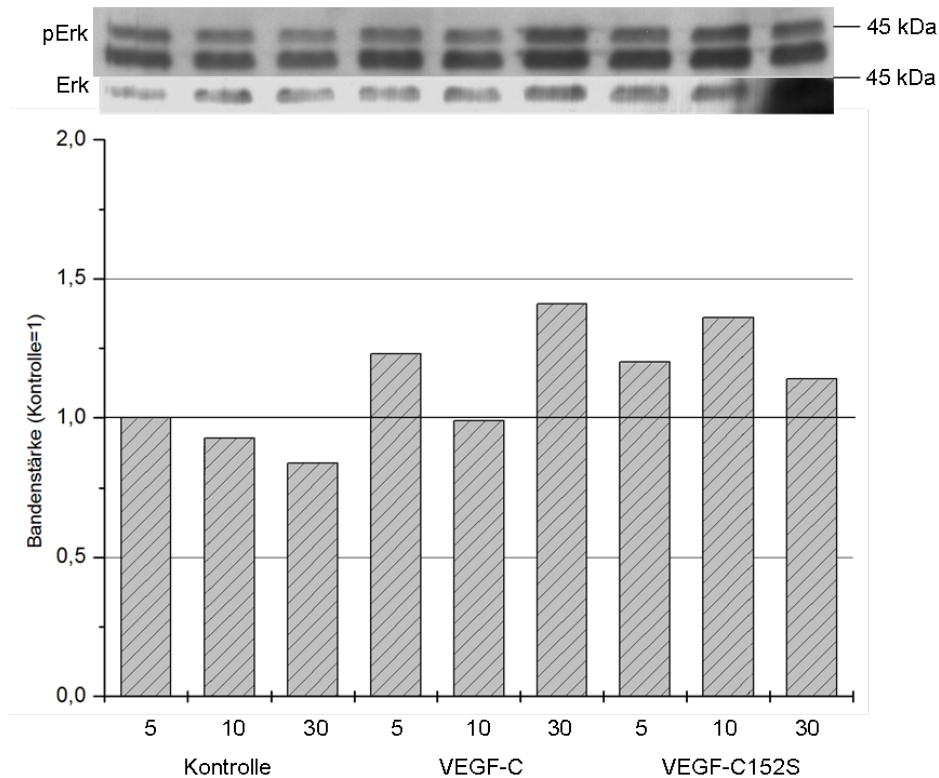


Abbildung 3.16: Kinetik der Erk-Phosphorylierung; 200 ng/ml, serumfrei, 24 h

Auch bei der Untersuchung der Stimulationsreihe mit dem ähnlich gebauten VEGF-C<sub>152S</sub>, der wie oben beschrieben nur aktiv gegenüber dem Rezeptor VEGFR-3 ist und nicht gegenüber VEGFR-2, konnten kongruente Ergebnisse erzielt werden (Abbildung 3.18).

Um nochmal zwischen den VEGFR-2 und -3-vermittelten Effekten zu unterscheiden, wurde erneut ein Versuch durchgeführt, der ausschließlich eine Stimulation von 10 Minuten mit VEGF-C und VEGF-D untersucht. Hier konnte unter beiden Stimuli, sowohl VEGF-C (stimuliert beide Rezeptoren) als auch VEGF-D (stimuliert nur VEGFR-3), eine deutliche Steigerung der Erk-Phosphorylierung nach 10 Minuten auf das 3fache nachgewiesen werden (Abbildung 3.19).

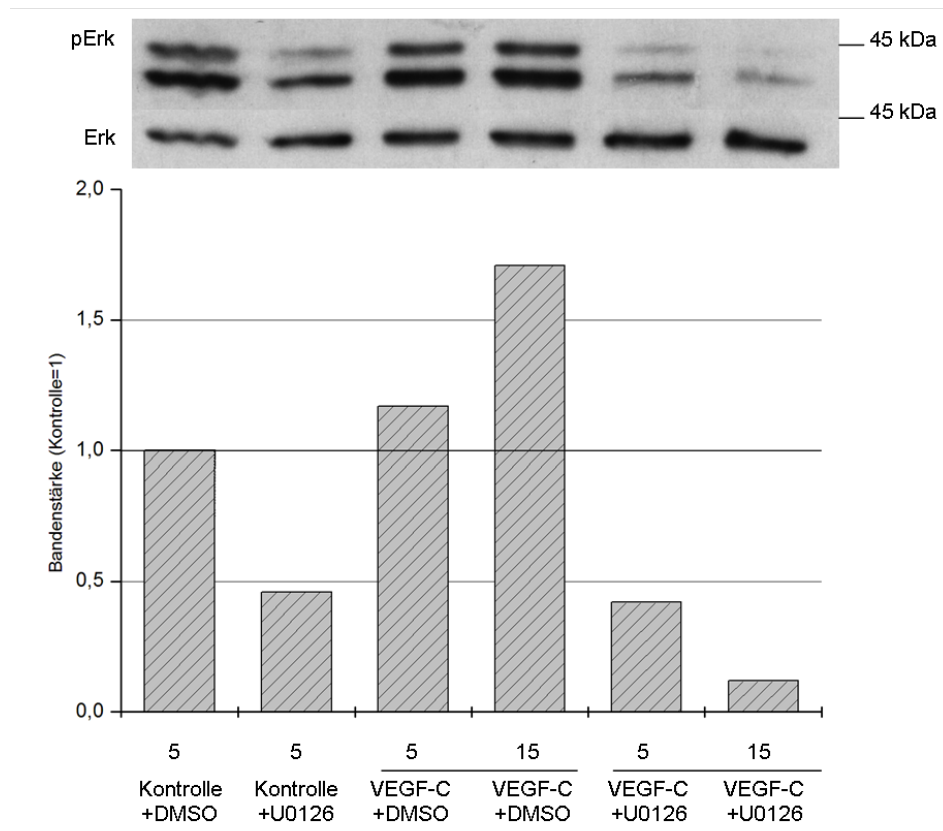


Abbildung 3.17: Zeitabhängigkeit der Erk-Phosphorylierung mit VEGF-C; 200 ng/ml, serumfrei, 24 h

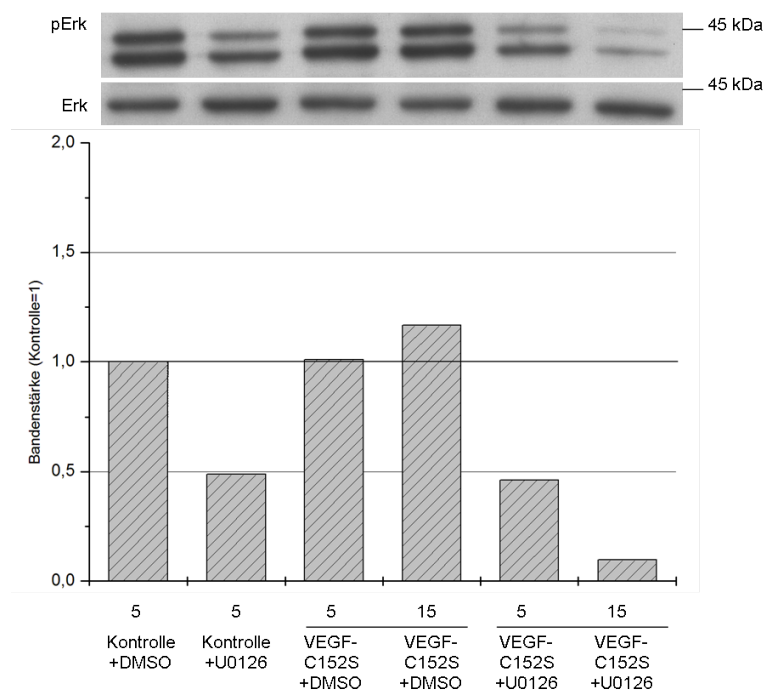


Abbildung 3.18: Zeitabhängigkeit der Erk-Phosphorylierung mit VEGF-C<sub>152S</sub>; 200 ng/ml, serumfrei, 24 h

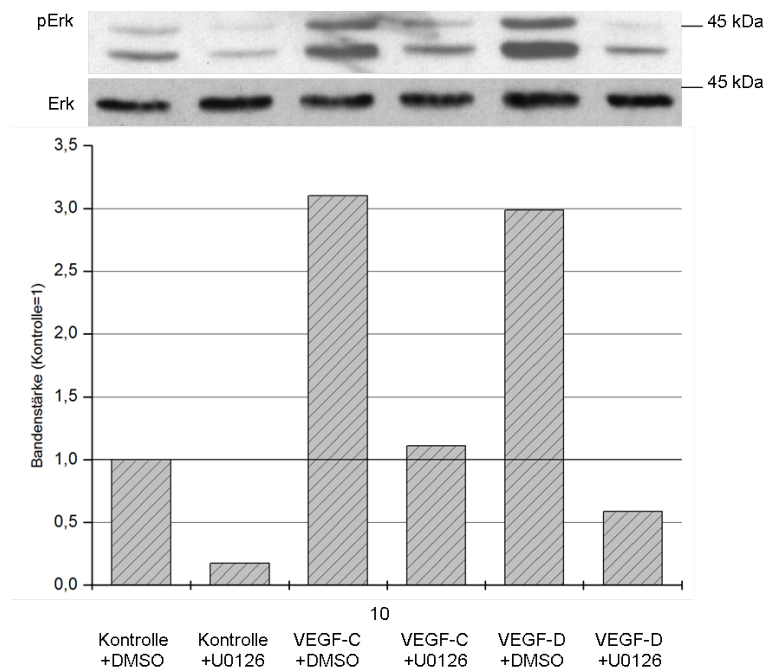


Abbildung 3.19: 10 Minuten Zeitabhängigkeit VEGF-C und VEGF-D mit/ohne Kinase-Inhibitor; 200 ng/ml, serumfrei, 24 h

### 3.4 Effekte von VEGF-C und -D auf die Proliferation der Glial precursor cells

Die Untersuchung, ob VEGF-C und VEGF-D Einflüsse auf die Proliferation der Glial precursor cells haben, ergaben eine eindeutige Proliferationssteigerung unter vorausgehender Stimulation mit VEGF-C und VEGF-D. Sowohl alleine als auch mit dem Lösungsmittel DMSO konnte eine proliferative Wirkung bei VEGF-C auf bis zu 188 % erzielt werden. U0126 scheint diese proliferative Wirkung aufzuheben, wobei die hohe Standardabweichung zu erwähnen ist, da es bei dieser Probenreihe große Unterschiede hinsichtlich der Messergebnisse gab. Die Stimulation der Glial precursor cells mit VEGF-D ergab noch eine signifikantere Steigerung der Proliferation auf über 200 % (Tabelle 3.1).

Tabelle 3.1: Effekte von VEGF-C und -D (100 ng/ml) alleine und in Kombination mit dem Kinaseinhibitor U0126 (100  $\mu$ M) auf die Proliferation (24 h) der Glial precursor cells (GPC)

	relative Proliferation [%]	Standardabweichung [%] (n)
<b>Kontrolle</b>	100,0	$\pm 11,6$ (n=4)
<b>Kontrolle+DMSO</b>	97,3	$\pm 12,7$ (n=3)
<b>Kontrolle+U0126</b>	102,7	$\pm 10,3$ (n=3)
<b>VEGF-C</b>	188,5	$\pm 8,9$ (n=4)
<b>VEGF-C+DMSO</b>	171,7	$\pm 8,8$ (n=3)
<b>VEGF-C+U0126</b>	93,0	$\pm 18,1$ (n=4)
<b>VEGF-D</b>	215,7	$\pm 5,3$ (n=4)
<b>VEGF-D+U0126</b>	175,4	$\pm 15,9$ (n=4)

### 3.5 Die Zellmigration im Scratchversuch

Die Migration der Glial precursor cells unter Stimulation von VEGF-D wurde mit dem sogenannten Scratch-Versuch untersucht. Drei unstimulierte Kontrollen wurden mit drei durch VEGF-D stimulierte Zellen verglichen, wobei die Ergebnisse auf die Kontrolle normiert wurden. Wie in der Abbildung 3.20 zu erkennen ist, erzielt die Stimulation mit VEGF-D (100 ng/ml) eine signifikante Steigerung (\*\*\*)  $p \leq 0,001$ ; \*\*  $p \leq 0,01$ ; \*  $p \leq 0,05$ ) der Migrationsfähigkeit der Glial precursor cells. Während die Kontrollzellen ihren Höhepunkt schon nach sechs Stunden erreichen, migrieren die stimulierten Zellen auch nach acht Stunden noch enorm (Abbildung 3.20). Somit steigert VEGF-D nicht nur die Migrationsgeschwindigkeit, außerdem beginnen die Zellen nach der Verletzung früher mit dem Einwandern in den Spalt als die unstimulierten Kontrollzellen. Anhand der Bilderauswahl 3.21 ist zu erkennen, dass sich der Spalt nach zehn Stunden Versuchsdauer unter Stimulation mit VEGF-D nahezu vollständig mit den Glial precursor cells aufgefüllt hat, während der Scratch in der unstimulierte Kontrolle nur vereinzelt Zellen aufweist.

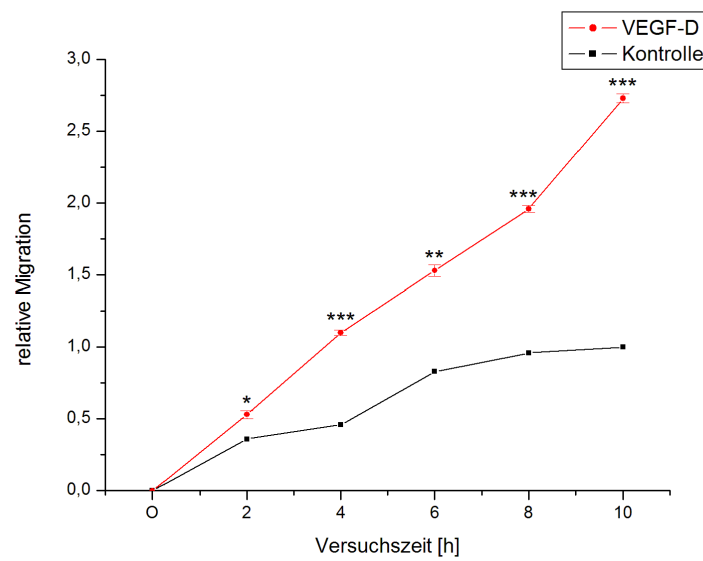


Abbildung 3.20: Verlauf der Migration mit und ohne Stimulation mit VEGF-D (100 ng/ml)

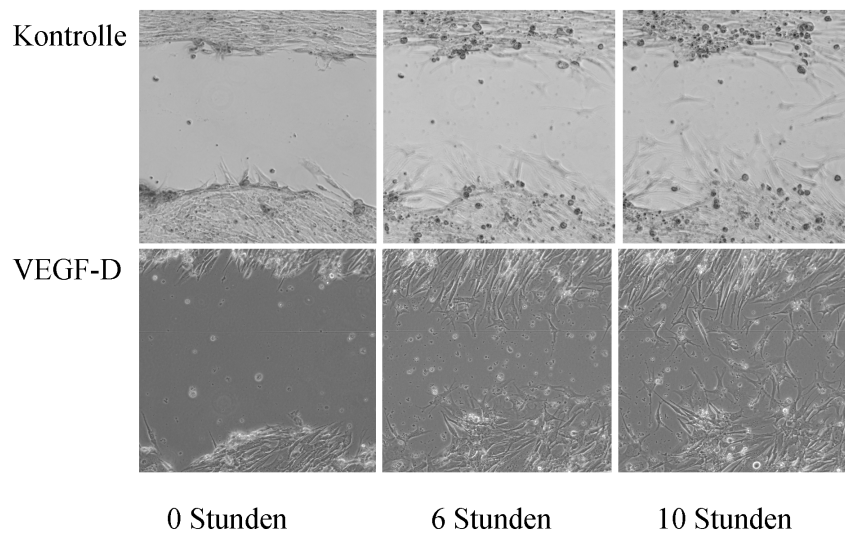


Abbildung 3.21: Einzelbilder des Migrationsverlauf zu Beginn, nach sechs und nach zehn Stunden

### 3.5.1 Genexpression der VEGF-Derivate in humanen kultivierten Zelllinien

Um ein umfassenderes Bild über die Expression des VEGF-C und VEGF-D, sowie des Rezeptors VEGFR-3 zu erhalten, wurden auch diverse kultivierte humane Glioblastomlinien und die humane Nabelschnurendothelzellen HUVEC (Human Umbilical Vein Endothelial Cells) auf ihren Gehalt an den VEGF und VEGFR-3 untersucht.

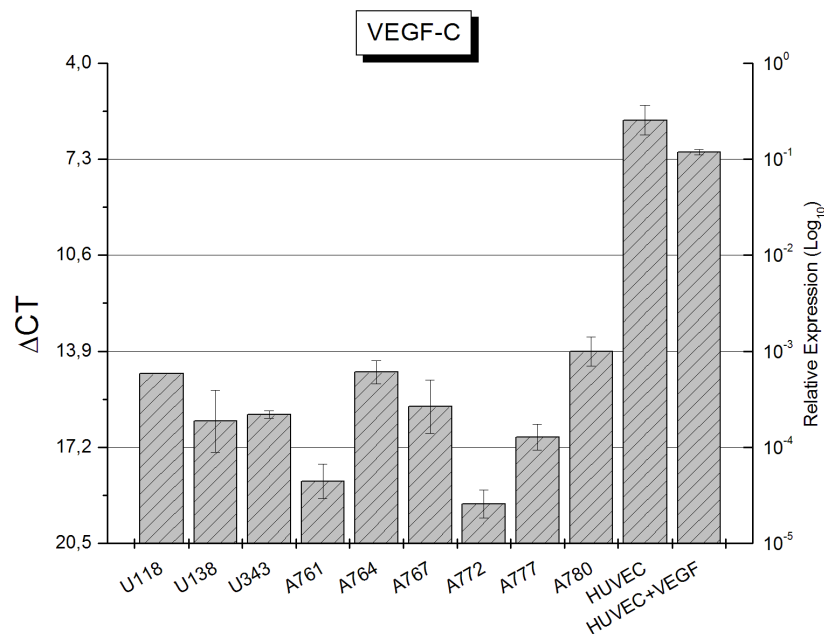


Abbildung 3.22: VEGF-C-Expression in humanen Zelllinien

Wie in Abbildung 3.22 zu sehen ist, konnte VEGF-C in allen neun Glioblastomlinien und in den Nabelschnurendothelien nachgewiesen werden. Die humanen Nabelschnurendothelzellen wurden sowohl unstimuliert, als auch mit VEGF-A stimuliert untersucht.

Der Faktor VEGF-D konnte allerdings in vier von den neun untersuchten Glioblastomlinien nicht nachgewiesen werden (Abbildung 3.23); auch die stimulierten HUVEC-Zellen exprimieren kein VEGF-D. (Abbildung 3.23)

Die Expression des Rezeptors VEGFR-3 konnte in acht von neun Glioblastomlinien in nur mäßiger Ausprägung detektiert werden. Die humanen Nabelschnurendothelzellen dagegen haben im Vergleich zu den Glioblastomen eine um 1000fach höhere VEGFR-3-Expression, sowohl unstimuliert als auch stimuliert (Abbildung 3.24).

Die Expression von VEGF-D und VEGFR-3 sind bei diesen humanen Zelllinien sehr gering, so dass diese im Rahmen dieser Arbeit nicht weiter untersucht werden.



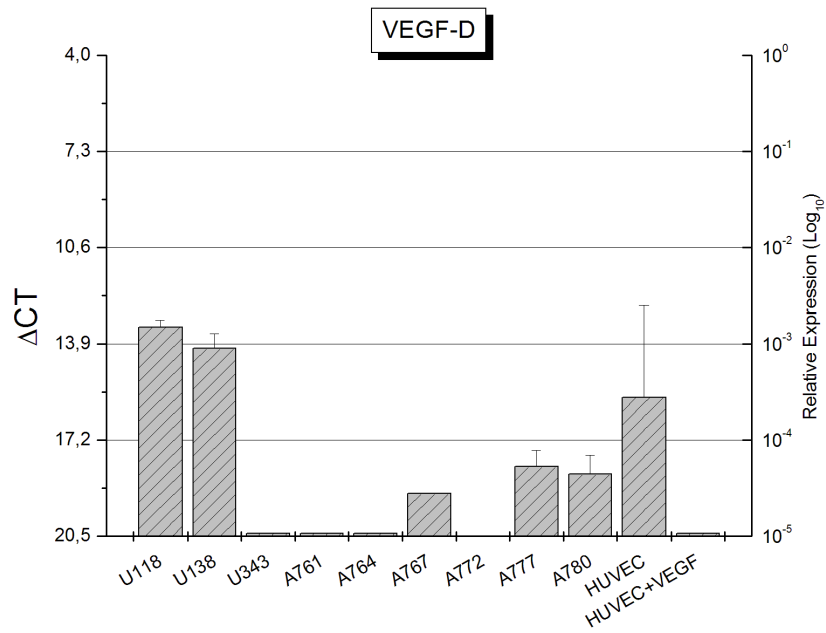


Abbildung 3.23: VEGF-D-Expression in humanen Zelllinien

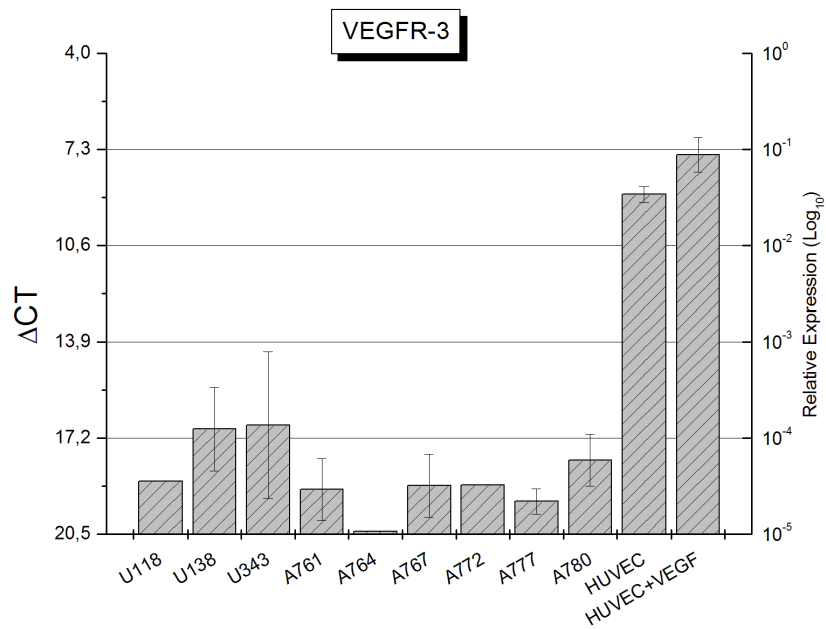


Abbildung 3.24: VEGFR-3-Expression in humanen Zelllinien



---

# Kapitel 4

## Diskussion

### 4.1 Angiogenese und Neurogenese

Die Entwicklung des Zentralen Nervensystems hängt von einem konstanten Zusammenspiel zwischen neuronalen Zellen und dem zerebralen Gefäßnetzwerk ab. Die Neurogenese und die Angiogenese beeinflussen sich nicht gegenseitig, haben aber mehr Gemeinsamkeiten als früher angenommen. Sie benutzen gemeinsame chemische Signale und Prinzipien, um sich zu differenzieren, zu wachsen und zu navigieren. Außerdem interagieren das Nervensystem und das Gefäßsystem miteinander, welches bei nicht eindeutiger Regulation zu medizinisch wichtigen Krankheiten führen kann. Als ein Beispiel sind einige Proteine zu nennen, die der axonalen Zielfindung dienen: Semaphorine, Ephrine, Slits, Netrine und ihre verwandten Rezeptoren Neuropilin, Eph und UNC5 (uncoordinated-5) regulieren einerseits die neurale Entwicklung, andererseits aber auch die Tumorangiogenese [24, 44].

Der Wachstumsfaktor VEGF ist der gemeinsame Nenner, der die Angiogenese, die Neurogenese und die Pathogenese des Gehirns miteinander verknüpft. Erst nur als Basis der vaskulären Effekte identifiziert, wurde längst erkannt, dass VEGF auch ein wichtiges Signalmolekül im Nervensystem ist. Die zerebrale Angiogenese in der Embryonalentwicklung wird hauptsächlich durch VEGF-A reguliert und durch Hypoxie über den Transkriptionsfaktor HIF-1 (hypoxia-inducible factor-1) induziert [13]. Die Signaltransduktion über den Rezeptor und darauf folgende Moleküle gleicht der Kaskade in nicht-neuronalen Geweben. Auch in Gehirnerkrankungen spielt VEGF eine Rolle, wie zum Beispiel bei der Tumorangiogenese der Glioblastome [35]. Aber nicht nur bei der zerebralen embryonalen Angiogenese und in Gehirnerkrankungen spielt VEGF-A eine Rolle, sondern es begünstigt auch die Neurogenese im adulten Gehirn, im speziellen in der subventrikulären Zone (SVZ) der Seitenventrikel und der subgranulären Zone (SGZ) des Gyrus dentatus im Hippocampus [1] (Abbildung 4.1). Abgesehen von der Neurogenese kann VEGF-A auch neuroprotektiv und neurodegenerativ wirken [14]. Dagegen resultiert die Stimulation des Astrozytenwachstums und der Proliferation und Chemotaxis von Microgliazellen aus einer Aktivierung des Rezeptors VEGFR-1 [12].

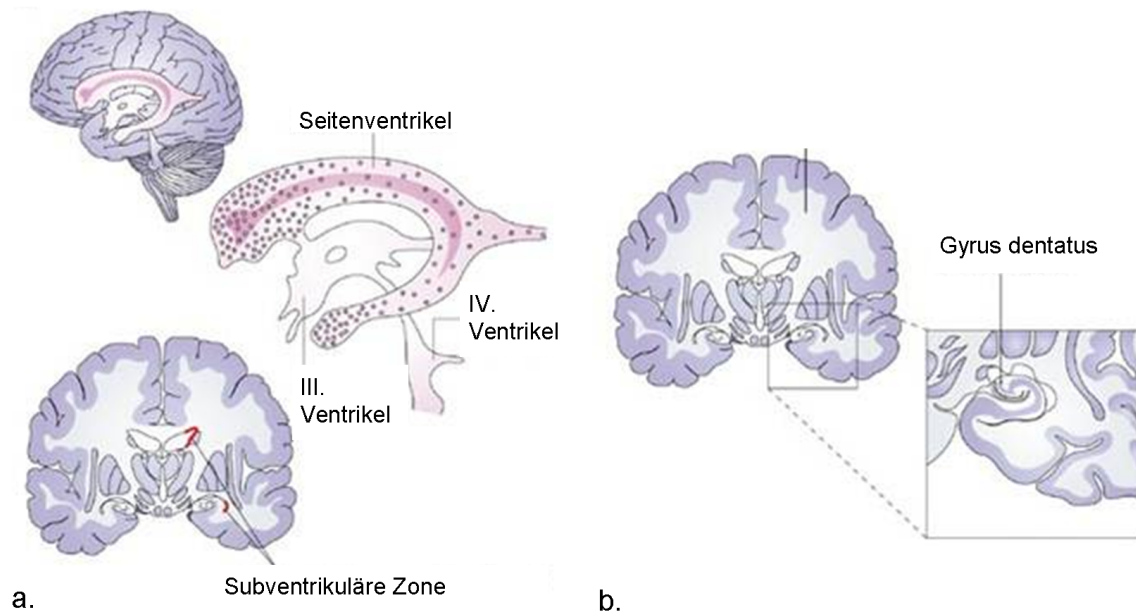


Abbildung 4.1: a. Die subventrikuläre Zone (SVZ) befindet sich entlang der Seitenwände der Seitenventrikel. b. Die subgranuläre Zone (SGZ) befindet sich im Gyrus dentatus des Hippocampus. [64]

## 4.2 VEGF-C, VEGF-D und VEGFR-3 im Zentralen Nervensystem

Es ist bisher wenig bekannt über das Vorkommen und die Effekte von VEGF-C und VEGF-D, sowie den Rezeptor VEGFR-3 im Zentralen Nervensystem. Le Bras et al. untersuchten im Jahr 2006 VEGF-C und VEGFR-3 in Oligodendrozyten-Vorläuferzellen. Die Ergebnisse der Versuche ergaben, dass VEGF-C ein wichtiger Faktor bei der Entwicklung des Embryonalgehirns in *Xenopus laevis* und der Maus ist. Ohne das Vorkommen von VEGF-C entwickeln sich durch Defekte der Lymphgefäße Ödeme. Eine Interaktion zwischen VEGF-C und VEGFR-3 ergibt eine direkte Unterstützung in der Entwicklung der neuralen Vorläuferzellen im embryonalen Gehirn. Hauptsächlich wurde VEGFR-3 im Mäusegehirn ab dem Embryonaltag E15,5 gefunden: Im suprachiasmatischen Bereich in ventrikulären und subventrikulären Zellen, im Sehnerv in Zellen, die den Transkriptionsfaktor  $Olig^{2+}$  exprimieren, ein Marker für Oligodendrozyten-Vorläufer, und im Bulbus olfactorius. VEGF-C hingegen wurde in angrenzenden Arealen der Sehnerv-Region gefunden. Weiterhin wurde herausgefunden, dass VEGF-C eine Proliferation von Oligodendrozyten-Vorläuferzellen induziert, aber nicht von Astroglialzellen im Sehnerv und dem suprachiasmatischen Bereich [26].

Diese Arbeit baut auf den Erkenntnissen von Le Bras et al. über den Faktor VEGF-C und den Rezeptor VEGFR-3 auf, wobei das Hauptaugenmerk hierbei auf den Wachstumsfaktor VEGF-D im Zusammenspiel mit VEGFR-3 gerichtet ist. Da über VEGF-D/VEGFR-3 im Gehirn bisher kaum etwas bekannt ist, wurden zuerst allgemeine Untersuchungen in Hinblick auf die Genexpression im Gehirn an verschiedenen Zelltypen und Zelllinien durchgeführt, um herauszufinden, ob und welche Zellen VEGF-D/VEGFR-3 exprimieren.

Da in den frühen Progenitorzellen, den Glial precursor cells, die höchste Genexpression von VEGF-D und VEGFR-3 detektiert wurde, wurden alle funktionellen Untersuchungen im Rahmen dieser Arbeit mit diesen Zellen durchgeführt.

#### 4.2.1 Charakterisierung der Glial precursor cells (GPC)

Alle funktionellen Versuche in dieser Arbeit wurden mit den Astrozyten/Oligodendrozyten-Vorläuferzellen Glial precursor cells gemacht. Ihre genauere Gewinnung und Charakterisierung wird folgend beschrieben:

Die immortalisierten Glial precursor cells (GPC) werden aus dissoziierten Gehirnzellen von P2-Mäusen hergestellt, die mit einem Temperatur-empfindlichen SV40-Konstrukt (pSVLTsA58 zur Verfügung gestellt von Dr. P. Rouget, Paris) [62] transfiziert wurden (Calcium-Phosphat-Methode). Stabil transfizierte Zellen erhält man durch Zugabe von G418-Sulfat über vier Wochen (400  $\mu\text{g}/\text{ml}$ , zugegeben erstmals nach zwei Tagen), welche durch Immunfärbung für das SV40 T large Antigen (Antikörper von Dr. P. Rouget) überprüft werden. Aus diesen stabil transfizierten Zellen wird ein Klon ausgewählt, der im Gliamarker A2B5 geschwenkt wird: Kulturschalen werden mit Anti-Maus IgG überdeckt (Ziege, Dako, Glostrup, Dänemark; 10  $\mu\text{g}/\text{ml}$  in PBS für 1h bei Raumtemperatur, dann mit BSA gespült und blockiert) und dann für 1h bei 4 °C mit antiA2B5-markierten Zellen inkubiert (Maus monoklonal, Chemicon; 1:40 in PBS für 45 Minuten bei 4 °C, danach gespült). Anschließend werden nicht haftende Zellen durch leichtes Schwenken entfernt. Die nun noch haftenden Zellen werden durch Trypsin-Behandlung abgelöst und weiter in Dulbecco's modifiziertem Eagle Medium (DMEM) mit 10 % FKS, 6 mM L-Glutamin und jeweils 100 IU/l Penicillin und Streptomycin bei 35 °C kultiviert. Diese immortalisierte Glial precursor cell-Linie wird in dieser Arbeit als GPC bezeichnet.

Die GPC sind stark A2B5 positiv, was charakteristisch für gliale Vorläufer Zellen und reifende Astrozyten ist. Sie sind dagegen schwach GFAP (glial fibrillary acidic protein) positiv, welches ein Protein ist und auf adulten Astrozyten gefunden wird und O4 negativ, welches auf späten Oligodendrozyten-Vorläuferzellen existiert. Außerdem reagieren die GPC negativ auf CD68, das auf Microgliazellen und Makrophagen zu finden ist und auf den Endothelzellmarker PECAM. [25] Deshalb können diese immortalisierten Gliazellen als eine gliale Vorläuferzelllinie bezeichnet werden, die sich in einem frühen Entwicklungsstadium befindet. Sie entwickelt

sich aus der Neuralen Stammzelle (NSC), aus der auch die Neurone entstehen. Diese A2B5<sup>+</sup> frühe Progenitorzelle kann sich in zwei verschiedene Richtungen weiter differenzieren (siehe Abbildung 4.2):

1. **Astrozyten:** GFAP<sup>+</sup>, A2B5<sup>-</sup>, O4<sup>-</sup>
2. **Oligodendrozyten:** Die Oligodendrozytenreifung verläuft in drei Stadien, die mit der späten Progenitorzelle (A2B5<sup>-</sup>, O4<sup>+</sup>) beginnt und über den nicht-myelinisierten Oligodendrozyten (O4<sup>+</sup>, CNP<sup>+</sup>, Galc<sup>+</sup>) mit dem myelinisierten Oligodendrozyt (O4<sup>-</sup>, CNP<sup>+</sup>, Galc<sup>+</sup>, PLP<sup>+</sup>, MBP<sup>+</sup>) vollendet ist.

In Hinblick auf die hohe VEGF-C und -D- Expression wird in dieser Arbeit die A2B5<sup>+</sup> frühe Progenitorzelle für funktionelle Studien wie Proliferation, Migration und Rezeptoraktivität verwendet. Diese gliale Vorläuferzelle hat den Vorteil, dass sie eine homogene Zellpopulation eines definierten Entwicklungsstadiums repräsentiert, welche konstant in einer gleich bleibenden Qualität verfügbar ist.

#### 4.2.2 Effekte von VEGF-C, VEGF-D und VEGFR-3 in Glial precursor cells

In den oben beschriebenen in-vitro-Versuchen wurde festgestellt, dass VEGF-C und -D, sowie VEGFR-3 am höchsten in den Glial precursor cells (GPC) exprimiert werden, dagegen aber nicht oder nur schwach in anderen Zelltypen des Gehirns wie Astrozyten, Oligodendrozyten, Neuronen oder Microgliazellen. In neuralen Stammzellen war die VEGFR-3-Expression 10fach schwächer als bei den GPC. Diese Ergebnisse korrespondieren mit zuvor erhobenen Untersuchungen, in denen VEGFR-3 nur kaum in Neurosphenen des Hippocampus, der subventrikulären Zone und des Bulbus olfactorius in adulten Ratten gefunden wurde [33]. Eine Untersuchung der Regulation von den VEGF-Derivaten und Rezeptoren ergab keine signifikanten Ergebnisse. Allein VEGF-A hat einen regulatorischen Effekt auf VEGFR-3 und verstärkt die Expression um ein 4,5faches. Die Liganden VEGF-C und VEGF-D werden in vitro mehr oder weniger stark in den meisten dieser Zelltypen produziert, in den GPC dagegen zeigen sich die höchsten Expressionswerte. Dies zeigt, dass VEGF-C/-D und der Rezeptor VEGFR-3 in glialen Vorläuferzellen ein autokrines System bilden und in dieser Entwicklungsstufe der Gliazellen eine Rolle spielen.

Funktionell bewirkt die Aktivierung von VEGFR-3 in GPC mit seinem selektiven murinen Ligand VEGF-D oder dem rekombinanten VEGF-C<sub>152S</sub> (oder mit VEGF-C, das auch VEGFR-2 stimuliert) eine Phosphorylierung der Kinasen Erk 1/2. Im murinem System ist VEGF-C ein Ligand für VEGFR-2 und -3, währenddessen VEGF-C<sub>152S</sub> und VEGF-D selektiv nur an VEGFR-3 binden. Nach der Stimulation mit den Faktoren konnte man eine Phosphorylierung der Kinasen Erk 1/2 (extracellular-signal related kinase) nachweisen, nicht aber von p38

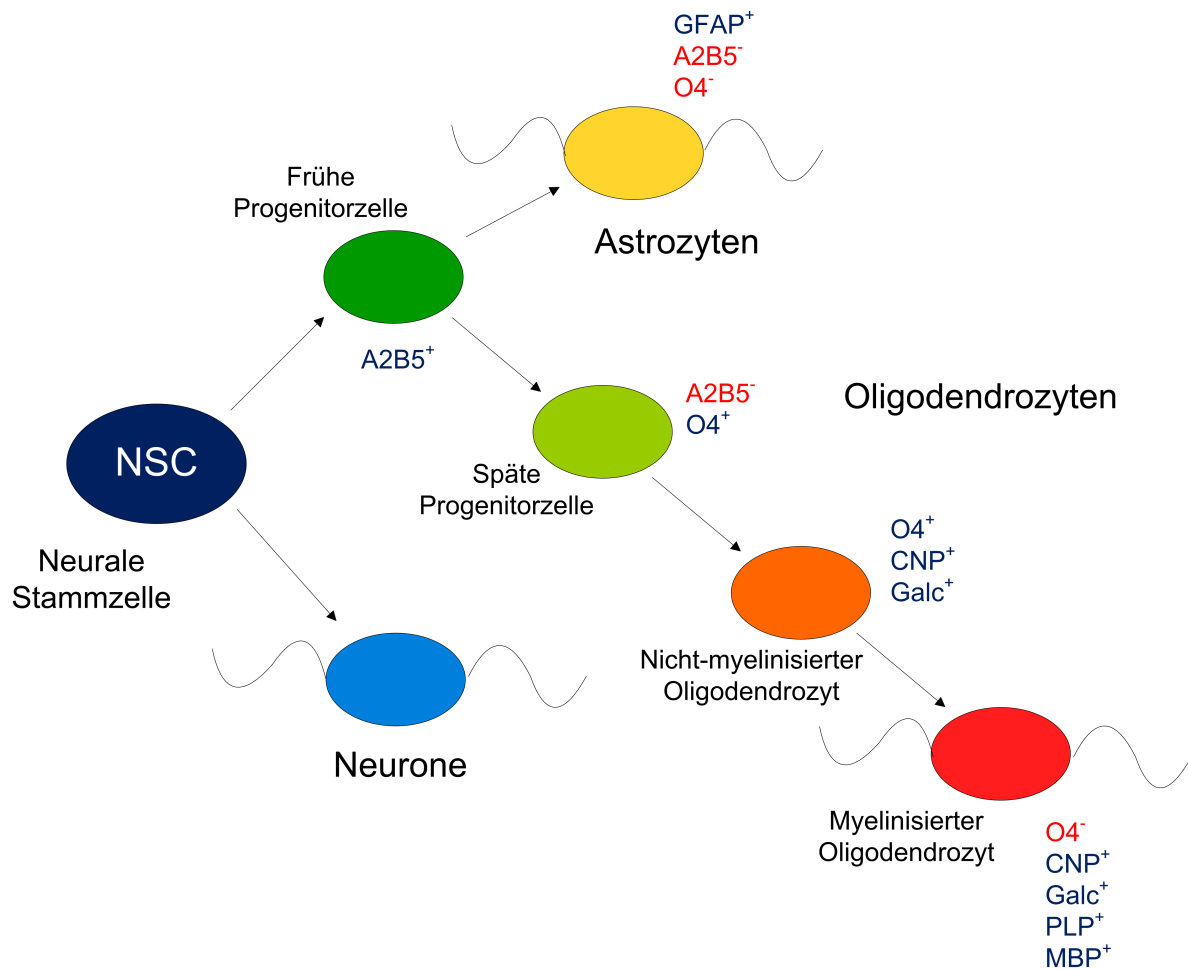


Abbildung 4.2: Neurale Stammzellen gelten als Vorläufer von einerseits den Neuronen (blau) und andererseits den Gliazellen. Diese, sowohl Astrozyten (gelb) als auch Oligodendrozyten (rot), entstehen aus den frühen Progenitorzellen. Die in dieser Arbeit genauer untersuchte Zelle ist die A2B5<sup>+</sup>- frühe Progenitorzelle (grün). Abkürzungen: CNP, cyclic nucleotid phosphodiesterase; Galc, Galactocerebro-sid; GFAP, Glial fibrillary acidic protein; MBP, Myelin basic protein; PLP, Pyridoxalphosphat.

oder Akt. Die Erk-Phosphorylierung wurde durch den MEK 1/2-Inhibitor UO126 gehemmt. Die MAPK-Kaskade (mitogen-activated protein kinase) ist eine der Signaltransduktionswege des VEGFR-3 in den Glial precursor cells, wie in der Abbildung 4.3 schematisch dargestellt ist.

In der Immunocytochemie wurden die Glial precursor cells auf ihren Gehalt an den Rezeptoren VEGFR-1, -2 und -3 getestet, was eine sichtbare Rotfärbung der Zellkörper ergab. VEGFR-2 ist im Vergleich zu VEGFR-1 und VEGFR-3 mit schwächerer Intensität sichtbar gemacht wor-

den. Aus diesen Ergebnissen lässt sich ableiten, dass auch die Proteine an den Glial precursor cells exprimiert werden und nicht nur die mRNA der Rezeptoren.

In dem in vitro-Experiment „Scratch-Assay“ wurde die Chemotaxis der GPC überprüft. In Gegenwart von VEGF-D wanderten die Zellen in 10 Stunden schneller als Kontrollzellen ohne Stimulation: Zuerst formten sie Ausläufer, dann wanderten die Zellkörper in den gescratchten Bereich. Dieser migratorische Effekt kann nicht nur durch Proliferation erklärt werden, da der proliferative Effekt des VEGF-D nach 10 Stunden wesentlich geringer ist. Diese Ergebnisse decken sich teilweise mit Ergebnissen der Proliferation von glialen und neuronalen Progenitorzellen in Mäusen ohne VEGF-C in situ. Hier ist die Zahl der Olig<sup>2+</sup> Oligodendrozyten-Vorläufer reduziert, jedoch nicht die Anzahl der Sox9<sup>+</sup>-radialen Glia und astrogliale Precursorzellen [26].

Zusammengefasst bedeutet dies, dass bestimmte Typen von neuronalen und glialen Vorläuferzellen in situ und in vitro auf das VEGF-C/D-VEGFR-3-Zusammenspiel angewiesen sind. In vitro produziert die A2B5<sup>+</sup>-Glial precursor cell VEGF-C und -D und exprimiert hohe Pegel des Rezeptors VEGFR-3. Die Stimulation von VEGFR-3 induziert sowohl den MAPK-Signaltransduktionsweg, die Zellproliferation als auch die Chemotaxis.



### Signalkaskade des VEGF-D/VEGFR-3-Komplexes

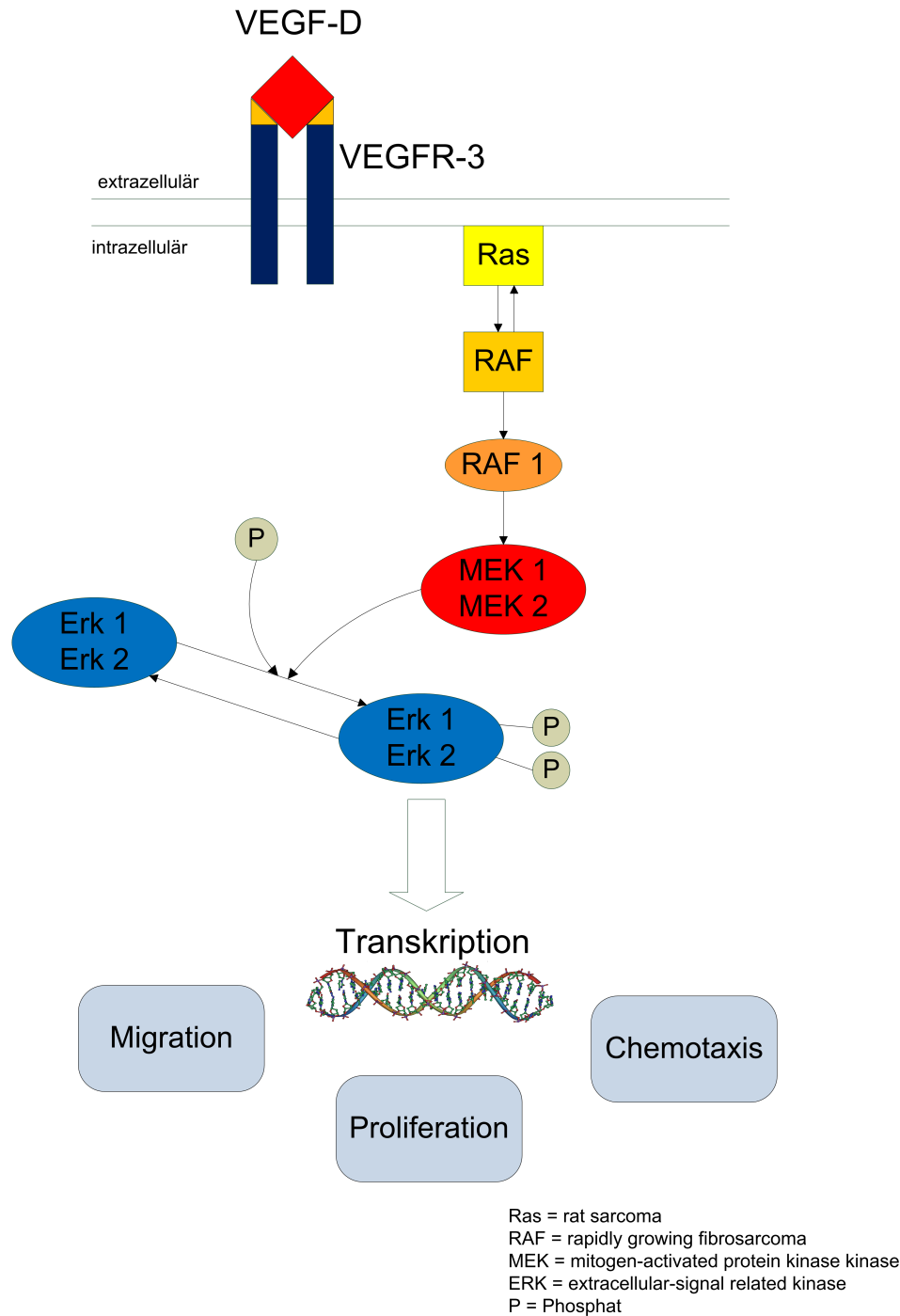


Abbildung 4.3: Schematische Darstellung des Signaltransduktionswegs, der nach Bindung des VEGF-D an seinen Rezeptor VEGFR-3 in der Zelle abläuft.



---

## Kapitel 5

### Zusammenfassung

Die VEGF-Familie besteht aus 7 Wachstumsfaktoren, wovon VEGF-C und VEGF-D in Hinblick auf ihre Funktionen im Zentralen Nervensystem bisher kaum untersucht sind. VEGF-C und VEGF-D ähneln sich in Struktur und Funktion und binden beide an die Rezeptoren VEGFR-2 und VEGFR-3. Während der Wachstumsfaktor VEGF-A ausschließlich für die Gefäßangiogenese verantwortlich ist, schreibt man VEGF-C und VEGF-D eine induktive Wirkung in Bezug auf die Lymphangiogenese zu.

Über die Rolle des VEGF-A während der Gehirnentwicklung ist bekannt, dass es neben der Angiogeneseinduktion auch andere vielfältige Effekte im ZNS aktiviert, wie zum Beispiel die Chemotaxis und Proliferation in Microgliazellen. Im Gegensatz zu VEGF-A ist bisher erst wenig über die Funktionen von VEGF-C und insbesondere VEGF-D bekannt. Le Bras et al. untersuchten im Jahr 2006 Oligodendrozyten-Vorläuferzellen auf ihren Gehalt an VEGF-C und VEGFR-3. Sie fanden heraus, dass sowohl VEGF-C als auch der Rezeptor VEGFR-3 im embryonalen Gehirn des *Xenopus laevis* und der Maus produziert wird. Auch die Proliferation von neuronalen Progenitorzellen wurde durch die Anwesenheit von VEGF-C/VEGFR-3 erhöht.

Um ein umfassenderes Bild darüber zu bekommen, beschäftigt sich diese Arbeit vorwiegend mit VEGF-D und VEGFR-3 und deren Vorkommen und Funktionen in Zellen des Zentralen Nervensystems. Beginnend wurden mehrere Zellen, wie z.B. Neuronen, Oligodendrozyten, Microgliazellen und Glial precursor cells auf ihren Gehalt an VEGF-D und den Rezeptor untersucht. Die Untersuchungen ergaben die höchste Expression in den A2B5<sup>+</sup>- Glial precursor cells (GPC). Die Glial precursor cells entwickeln sich ebenso wie die Neurone aus den Neuralen Stammzellen. Da sie nur ein Zwischenstadium darstellt, nennt man sie auch frühe Progenitorzelle. Aus ihr entwickeln sich einerseits die Astrozyten, andererseits die Oligodendrozyten, deren Reifung über die späte Progenitorzelle und den nicht-myelinisierten Oligodendrozyt mit dem myelinisierten Oligodendrozyt abgeschlossen ist. Für die weiteren Experimente wurden die Glial precursor cells verwendet, da sie ein stabiles Zellmodell repräsentieren.

Um herauszufinden, über welchen Signaltransduktionsweg VEGF-D nach der Bindung an seinen Rezeptor VEGFR-3 die Information weitergeleitet wird, wurden Western Blot-Versuche durchgeführt, deren Ergebnisse eine Aktivierung des Erk 1/2- Signalkaskade waren. Die funktionellen Studien im Rahmen dieser Arbeit umfassten die proliferative und chemotaktischen Induktion des VEGF-D. Eine deutliche Zunahme der Migrationsfähigkeit, sowie eine signifikante Proliferationssteigerung unter experimentellen Voraussetzungen zeigen, dass VEGF-D erhebliche Effekte auf die Glial precursor cells hat (Abbildung 5.1).

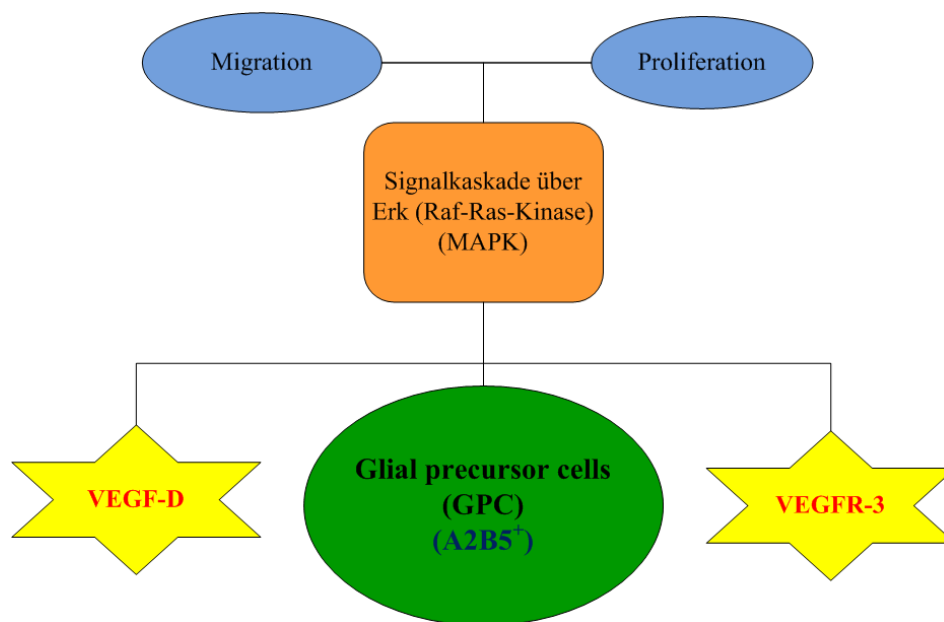


Abbildung 5.1: Zusammenfassung der Ergebnisse dieser Arbeit: Wirkung von VEGF-D/VEGFR-3 in Glial precursor cells (GPC)

---

## Literaturverzeichnis

- [1] ABROUS DN, KOEHL M und LE MOAL M: *Adult neurogenesis: from precursors to network and physiology*. *Physiol Rev*, 85:523–569, 2005.
- [2] ACHEN MG, JELTSCH M, KUKK E, MÄKINEN T, VITALI A, WILKS AF, ALITALO K und STACKER SA: *Vascular endothelial growth factor D (VEGF-D) is a ligand for the tyrosine kinases VEGF receptor 2 (Flk1) and VEGF receptor 3 (Flt4)*. *Proc Natl Acad Sci USA*, 95:548–553, 1998.
- [3] BALDWIN ME, CATIMEL B, NICE EC, ROUFAIL S, HALL NE, STENVERS KL, KARKKAINEN MJ, ALITALO K, STACKER SA und ACHEN MG: *The specificity of receptor binding by vascular endothelial growth factor-d is different in mouse and man*. *J Biol Chem*, 276:19166–19171, 2001.
- [4] BREIER G, ALBRECHT U, STERRER S und RISAU W: *Expression of vascular endothelial growth factor during embryonic angiogenesis and endothelial cell differentiation*. *Development*, 114:521–532, 1992.
- [5] CAO Y, JI WR, QI P und ROSIN A: *Placenta growth factor: identification and characterization of a novel isoform generated by RNA alternative splicing*. *Biochem Biophys Res Commun*, 235:493–498, 1997.
- [6] CROSS MJ, DIXELIUS J, MATSUMOTO T und CLAEISSON-WELSH L: *VEGF-receptor signal transduction*. *Trends Biochem Sci*, 28:488–494, 2003.
- [7] DEBINSKI W, SLAGLE-WEBB B, ACHEN MG, STACKER SA, TULCHINSKY E, GILLESPIE G und GIBO DM: *VEGF-D is an X-linked/AP-1 regulated putative onco-angiogen in human glioblastoma multiforme*. *Mol Med*, 7:598–608, 2001.
- [8] DIXELIUS J, MAKINEN T, WIRZENIUS M, KARKKAINEN MJ, WERNSTEDT C, ALITALO K und CLAEISSON-WELSH L: *Ligand-induced vascular endothelial growth factor receptor-3 (VEGFR-3) heterodimerization with VEGFR-2 in primary lymphatic endothelial cells regulates tyrosine phosphorylation sites*. *J Biol Chem*, 278:40973–40979, 2003.
- [9] FERRARA, N: *Vascular Endothelial Growth Factor: Basic Science and Clinical Progress*. *Endocr Rev*, 25:581–611, 2004.

- [10] FERRARA N, HENZEL WJ: *Pituitary follicular cells secrete a novel heparin-binding growth factor specific for vascular endothelial cells*. Biochem Biophys Res Commun, 161:851–858, 1989.
- [11] FONG GH, ROSSANT J, GERTSENSTEIN M und BREITMAN ML: *Role of the Flt-1 receptor tyrosine kinase in regulating the assembly of vascular endothelium*. Nature, 376:66–70, 1995.
- [12] FORSTREUTER F, LUCIUS R und MENTLEIN R: *Vascular endothelial growth factor induces chemotaxis and proliferation of microglial cells*. J Neuroimmunol, 132:93–98, 2002.
- [13] GOLDBERG MA, SCHNEIDER TJ: *Similarities between the oxygen-sensing mechanisms regulating the expression of vascular endothelial growth factor and erythropoietin*. J Biol Chem, 11:4355–4359, 1994.
- [14] GREENBERG DA, JIN K: *From angiogenesis to neuropathology*. Nature, 438:954–959, 2005.
- [15] GUPTA K, ZHANG J: *Angiogenesis: a curse or cure?* Postgrad Med J, 81:236–242, 2005.
- [16] IVAN M, KONDO K, YANG H, KIM W, VALIANDO J, OHH M, SALIC A, ASARA JM, LANE WS und KAEHLIN WG JR: *HIF $\alpha$  targeted for VHL-mediated destruction by proline hydroxylation: implications for O<sub>2</sub> sensing*. Science, 292:464–468, 2001.
- [17] JAAKKOLA P, MOLE DR, TIAN YM, WILSON MI, GIELBERT J, GASKELL S, KRIEGSHEIM AV, HEBESTREIT HF, MUKHERJI M, SCHOFIELD CJ, MAXWELL PH, PUGH CW und RATCLIFFE PJ: *Targeting of HIF- $\alpha$  to the von Hippel-Lindau ubiquitylation complex by O<sub>2</sub>-regulated prolyl hydroxylation*. Science, 292:468–72, 2001.
- [18] JAKEMAN LB, ARMANINI M, PHILLIPS HS und FERRARA N: *Developmental expression of binding sites and messenger ribonucleic acid for vascular endothelial growth factor suggests a role for this protein in vasculogenesis and angiogenesis*. Endocrinology, 133:848–859, 1993.
- [19] JAKEMAN LB, WINER J, BENNETT GL, ALTAR CA und FERRARA N: *Binding sites for vascular endothelial growth factor are localized on endothelial cells in adult rat tissues*. J Clin Invest, 89:244–253, 1992.
- [20] JENNY B, HARRISON JA, BAETENS D, TILLE JC, BURKHARDT K, MOTTAZ H, KISS JZ, DIETRICH PY, DE TRIBOLET N, PIZZOLATO GP und PEPPER MS: *Expression and localization of VEGF-C and VEGFR-3 in glioblastomas and haemangioblastomas*. J Pathol, 209:34–43, 2006.

- 
- [21] JOUKOV V, PAJUSOLA K, KAIPAINEN A, CHILOV D, LAHTINEN I, KUKK E, SAKSELA O, KALKKINEN N und ALITALO K: *A novel vascular endothelial growth factor, VEGF-C, is a ligand for the Flt4 (VEGFR-3) and KDR (VEGFR-2) receptor tyrosine kinases.* EMBO J, 15:290–298, 1996.
- [22] KENDALL RL, THOMAS KA: *Inhibition of vascular endothelial cell growth factor activity by an endogenously encoded soluble receptor.* Proc Natl Acad Sci USA, 90:10705–10709, 1993.
- [23] KIBA A, YABANA N und SHIBUYA M: *A set of loop-1 and -3 structures in the novel vascular endothelial growth factor (VEGF) family member, VEGF-ENZ-7, is essential for the activation of VEGFR-2 signaling.* J Biol Chem, 278:13453–13461, 2003.
- [24] KLAGSBRUN M, EICHMANN A: *A role for axon guidance receptors and ligands in blood vessel development and tumor angiogenesis.* Cytokine Growth Factor Rev, 16:535–548, 2005.
- [25] LAYWELL ED, STEINDLER DA und SILVER DJ: *Astrocytic stem cells in the adult brain.* Neurosurg Clin N Am, 18:21–30, 2007.
- [26] LE BRAS, B, BARALLOBRE M J, HOMMAN-LUDIYE J, NY A, WYNS S, TAMMELA T, HAIKO P, KARKKAINEN M J, YUAN L, MURIEL M P, E CHATZOPOULOU, BRÉANT C, ZALC B, CARMELIET P, ALITALO K, EICHMANN A und THOMAS J L: *VEGF-C is a trophic factor for neural progenitors in the vertebrate embryonic brain.* Nat Neurosci, 9:340–348, 2006.
- [27] LIVAK KJ, SCHMITTGEN TD: *Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the  $2^{-\Delta\Delta CT}$  Method.* Methods, 25:402–408, 2001.
- [28] LOHELA M, SAARISTO A, VEIKKOLA T und ALITALO K: *Lymphangiogenic growth factors, receptors and therapies.* Thromb Haemost, 90:167–184, 2003.
- [29] LYTTLE DJ, FRASER KM, FLEMING SB, MERCER AA und ROBINSON AJ: *Homologs of vascular endothelial growth factor are encoded by the poxvirus orf virus.* J Virol, 68:84–92, 1994.
- [30] MAGLIONE D, GUERRIERO V, VIGLIETTO G, FERRARO MG, APRELIKOVA O, ALITALO K, DEL VECCHIO S, LEI KJ, CHOU JY und PERSICO MG: *Two alternative mRNAs coding for the angiogenic factor, placenta growth factor (PlGF), are transcribed from a single gene of chromosome 14.* Oncogene, 8:925–931, 1993.
- [31] MAGLIONE D, GUERRIERO V, VIGLIETTO G, DELLI-BOVI P und PERSICO MG: *Isolation of a human placenta cDNA coding for a protein related to the vascular permeability factor.* Proc Natl Acad Sci USA, 88:9267–9271, 1991.

- [32] MATSUMOTO T, CLAEISSON-WELSH L: *VEGF receptor signal transduction*. Sci STKE, 112:RE21, 2001.
- [33] MAURER MH, TRIPPS WK, FELDMANN RE JR und KUSCHINSKY W: *Expression of vascular endothelial growth factor and its receptors in rat neural stem cells*. Neurosci Lett, 3:165–168, 2003.
- [34] MCCOLL BK, BALDWIN ME, ROUFAIL S, FREEMAN C, MORITZ RL, SIMPSON RJ, ALITALO K, STACKER SA und ACHEN MG: *Plasmin activates the lymphangiogenic growth factors VEGF-C and VEGF-D*. J Exp Med, 198:863–868, 2003.
- [35] MENTLEIN R, HELD-FEINDT J: *Angiogenesis factors in gliomas: a new key to tumour therapy?* Naturwissenschaften, 90:385–94, 2003.
- [36] MEYER M, CLAUSS M, LEPPLE-WIENHUES A, WALTENBERGER J, AUGUSTIN HG, ZICHE M, LANZ C, BÜTTNER M, RZIHA HJ und DEHIO C: *A novel vascular endothelial growth factor encoded by Orf virus, VEGF-E, mediates angiogenesis via signalling through VEGFR-2 (KDR) but not VEGFR-1 (Flt-1) receptor tyrosine kinases*. EMBO J, 18:363–374, 1999.
- [37] MÄKINEN T, VEIKKOLA T, MUSTJOKI S, KARPANEN T, CATIMEL B, NICE EC, WISE L, MERCER A, KOWALSKI H, KERJASCHKI D, STACKER SA, ACHEN MG und ALITALO K: *Isolated lymphatic endothelial cells transduce growth, survival and migratory signals via the VEGF-C/D receptor VEGFR-3*. EMBO J, 20:4762–4773, 2001.
- [38] NASH AD, BACA M, WRIGHT C und SCOTNEY PD: *The biology of vascular endothelial growth factor-B (VEGF-B)*. Pulm Pharmacol Ther, 19:61–69, 2005.
- [39] NEUFELD G, COHEN T, GENGRINOVITCH S und POLTORAK Z: *Vascular endothelial growth factor (VEGF) and its receptors*. FASEB, 13:9–22, 1999.
- [40] OGUNSHOLA OO, ANTIC A, DONOGHUE MJ, FAN SY, KIM H, STEWART WB, MADRI JA und MENT LR: *Paracrine and autocrine functions of neuronal vascular endothelial growth factor (VEGF) in the central nervous system*. J Biol Chem, 277:11410–11415, 2002.
- [41] OLOFSSON B, PAJUSOLA K, KAIPAINEN A, VON EULER G, JOUKOV V, SAKSELA O, ORPANA A, PETTERSSON RF, ALITALO K und ERIKSSON U: *Vascular endothelial growth factor B, a novel growth factor for endothelial cells*. Proc Natl acad Sci USA, 93:2576–2581, 1996.
- [42] ORLANDINI M, MARCONCINI L, FERRUZZI R und OLIVIERO S: *Identification of a c-fos-induced gene that is related to the platelet-derived growth factor/vascular endothelial growth factor family*. Proc Natl Acad Sci USA, 93:11675–11680, 1996.



- [43] OTROCK ZK, MAKAREM JA und SHAMSEDDINE AI: *Vascular endothelial growth factor family of ligands and receptors: review*. Blood Cells Mol Dis, 38:258–268, 2007.
- [44] P, CARMELIET: *Blood vessels and nerves: common signals, pathways and diseases*. Nat Rev Genet, 4:710–720, 2003.
- [45] PAAVONEN K, PUOLAKKAINEN P, JUSSILA L, JAHKOLA T und ALITALO K: *Vascular endothelial growth factor receptor-3 in lymphangiogenesis in wound healing*. Am J Pathol, 156:1499–1450, 2000.
- [46] PARK JE, CHEN HH, WINER J, HOUCK KA und FERRARA N: *Placenta growth factor. Potentiation of vascular endothelial growth factor bioactivity, in vitro and in vivo, and high affinity binding to Flt-1 but not to Flk-1/KDR*. J Biol Chem, 269:25646–25654, 1994.
- [47] PARTANEN TA, ALITALO K und MIETTINEN M: *Lack of lymphatic vascular specificity of vascular endothelial growth factor receptor 3 in 185 vascular tumors*. Cancer, 86:2406–2412, 1999.
- [48] PERSICO MG, VINCENTI V und DiPALMA T: *Structure, expression and receptor-binding properties of placenta growth factor (PlGF)*. Curr Top Microbiol Immunol, 237:31–40, 1999.
- [49] PETERS KG, DE VRIES C und WILLIAMS LT: *Vascular endothelial growth factor receptor expression during embryogenesis and tissue repair suggests a role in endothelial differentiation and blood vessel growth*. Proc Natl Acad Sci USA, 90:8915–8919, 1993.
- [50] ROBINSON CJ, STRINGER SE: *The splice variants of vascular endothelial growth factor (VEGF) and their receptors*. J Cell Sci, 114:853–865, 2001.
- [51] SCHÄNZER A, WACHS FP, WILHELM D, ACKER T, COOPER-KUHN C, BECK H, WINKLER J, AIGNER L, PLATE KH und KUHN HG: *Direct stimulation of adult neural stem cells in vitro and neurogenesis in vivo by vascular endothelial growth factor*. Brain Pathol, 14:237–248, 2004.
- [52] SENGER D R, GALLI S J, DVORAK A M, PERRUZZI C A, HARVEY V S und DVORAK H F: *Tumor cells secrete a vascular permeability factor that promotes accumulation of ascites fluid*. Science, 219:983–985, 1983.
- [53] SHEN H, CLAUSS M, RYAN J, SCHMIDT AM, TIJBURG P, BORDEN L, CONNOLLY D, STERN D und KAO J: *Characterization of vascular permeability factor/vascular endothelial growth factor receptors on mononuclear phagocytes*. Blood, 81:2767–2773, 1993.
- [54] SHIBUYA M, YAMAGUCHI S, YAMANE A, IKEDA T, TOJO A, MATSUSHIME H und SATO M: *Nucleotide sequence and expression of a novel human receptor-type tyrosine kinase gene (flt) closely related to the fms family*. Oncogene, 5:519–524, 1990.

- [55] SIEGFRIED G, BASAK A, CROMLISH JA, BENJANNET S, MARCINKIEWICZ J, CHRÉTIEN M, SEIDAH NG und KHATIB AM: *The secretory proprotein convertases furin, PC5, and PC7 activate VEGF-C to induce tumorigenesis.* J Clin Invest, 111:1723–1732, 2003.
- [56] SILINS G, GRIMMOND S, EGERTON M und HAYWARD N: *Analysis of the promoter region of the human VEGF-related factor gene.* Biochem Biophys Res Commun, 230:413–418, 1997.
- [57] SONDELL M, LUNDBORG G und KANJE M: *Vascular endothelial growth factor has neurotrophic activity and stimulates axonal outgrowth, enhancing cell survival and Schwann cell proliferation in the peripheral nervous system.* J Neurosci, 19:5731–5740, 1999.
- [58] STACKER SA, STENVERS K, CAESAR C, VITALI A, DOMAGALA T, NICE E, ROUFAIL S, SIMPSON RJ, MORITZ R, KARPANEN T, ALITALO K und ACHEN MG: *Biosynthesis of vascular endothelial growth factor-D involves proteolytic processing which generates non-covalent homodimers.* J Biol Chem, 274:32127–32136, 1999.
- [59] SUTO K, YAMAZAKI Y, MORITA T und MIZUNO H: *Crystal structures of novel vascular endothelial growth factors (VEGF) from snake venoms: insight into selective VEGF binding to kinase insert domain-containing receptor but not to fms-like tyrosine kinase-1.* J Biol Chem, 280:2126–2131, 2004.
- [60] TAKAHASHI T, UENO H und SHIBUYA M: *VEGF activates protein kinase C-dependent, but Ras-independent Raf-MEK-MAP kinase pathway for DNA synthesis in primary endothelial cells.* Oncogene, 18:2221–22230, 1999.
- [61] TERMAN BI, CARRION ME, KOVACS E, RASMUSSEN BA, EDDY RL und SHOWS TB: *Identification of a new endothelial cell growth factor receptor tyrosine kinase.* Oncogene, 6:1677–1683, 1991.
- [62] THI AD, EVRARD C und ROUGET P: *Proliferation and differentiation properties of permanent Schwann cell lines immortalized with a temperature-sensitive oncogene.* J Exp Biol, 201:851–860, 1998.
- [63] VAISMAN N, GOSPODAROWICZ D und NEUFELD G: *Characterization of the receptors for vascular endothelial growth factor.* J Biol Chem, 15:19461–19466, 1990.
- [64] VESCOVI AL, GALLI R und REYNOLDS BA: *Brain tumour stem cells.* Nat Rev Cancer, 6:425–36, 2006.
- [65] WISE LM, VEIKKOLA T, MERCER AA, SAVORY LJ, FLEMING SB, CAESAR C, VITALI A, MAKINEN T, ALITALO K und STACKER SA: *Vascular endothelial growth factor (VEGF)-like protein from orf virus NZ2 binds to VEGFR2 and neuropilin-1.* Proc Natl Acad Sci USA, 96:3071–3076, 1999.

- [66] YAMADA Y, NEZU J, SHIMANE M und HIRATA Y: *Molecular cloning of a novel vascular endothelial growth factor, VEGF-D*. Genomics, 42:483–488, 1997.
- [67] YANG W, AHN H, HINRICHS M, TORRY RJ und TORRY DS: *Evidence of a novel isoform of placenta growth factor (PlGF-4) expressed in human trophoblast and endothelial cells*. J Reprod Immunol, 60:53–60, 2003.



---

## Danksagung

Mein besonderer Dank gilt Herrn Prof. Dr. Rolf Mentlein für die interessante Aufgabenstellung und für die sehr nette und immer ausführliche Betreuung im Rahmen der Durchführung dieser Arbeit. Er stand mir bei jeder Frage und jeden Problemen immer freundlich zur Seite und hat dazu beigetragen, dass ich diese Arbeit mit viel Freude durchführen konnte.

Ferner danke ich auch Herrn Prof. Dr. Ralph Lucius, der mich bei der Wahl des Themas unterstützt hat.

Des Weiteren möchte ich mich sehr bei meiner Arbeitsgruppe bedanken, Martina Burmester, Miriam Lemmer, Kirsten Hattermann, Daniel Oxmann und Thomas Schlorf, die mir bei den Methoden tatkräftig mit vielen Tipps zur Seite standen.

Ebenfalls möchte ich mich bei meinem Freund Lars Oliver Härtel bedanken, der mich nicht nur bei der Umsetzung der schriftlichen Ausführung und der Grafikerstellung stets unterstützt hat, sondern vom ersten Tag an bei der Entstehung dieser Arbeit eine große Hilfe gewesen war.

Abschließend bedanke ich mich bei meinen Eltern für ihre liebevolle Unterstützung während des gesamten Studiums.



---

# Lebenslauf

## Persönliche Daten

Sandra Kranich  
Blocksberg 10  
24103 Kiel

Geb. am 08. 10. 1983 in Pinneberg  
Ledig, deutsch

## Schulbildung

1990–1994	Grundschule Schacht-Audorf
1994–2003	Helene-Lange-Gymnasium Rendsburg
Juni 2003	Allgemeine Hochschulreife

## Studium

10/2003–02/2006	Vorklinisches Studium der Zahnmedizin an der Christian-Albrechts-Universität zu Kiel
09/2004	Naturwissenschaftliche Vorprüfung
10/2006	Zahnärztliche Vorprüfung
10/2006–02/2009	Klinisches Studium der Zahnmedizin an der Christian-Albrechts-Universität zu Kiel
02/2009–07/2009	Zahnärztliche Prüfung
10.07.2009	Approbation als Zahnärztin